

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. W. Eisenmenger

**Drogenscreening im Urin mittels Enzymimmunoassays:
Methodenvergleich verschiedener Technologien**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Friedrich-Michael Ryckmanns
aus München

2003

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
Der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. L. von Meyer
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. B. Elsenhans
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. K. Peter
Tag der mündlichen Prüfung:	06. November 2003

Meiner lieben Stefanie
Meiner lieben Großmutter Marie-Rose Wellano
und
Meinen lieben Eltern

In Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. Einführung in die Thematik	Seite	7
1.1. <u>Notwendigkeit des Drogenscreenings</u>		7
1.2. <u>Drogenscreening: klinische Chemie mit vielen Einsatzgebieten</u>		8
1.2.1. Definition		8
1.2.2. Einsatzgebiete von Screeningverfahren		8
1.2.3. Wissenschaftliche Möglichkeiten der Diagnostik		9
1.3. <u>Methoden im Vergleich: Präsentation der Dissertation</u>		11
1.3.1. Vorstellung verschiedener Assays als Gegenstand der Studie		11
2. Der Enzymimmunoassay, ein standardisiertes Verfahren	Seite	13
2.1. <u>Definition</u>		13
2.2. <u>Heterogene und homogene Assays</u>		13
2.3. <u>Aufbau und Ablauf der verwendeten Testverfahrens</u>		15
2.3.1. Antikörper, Kreuzreaktivität und Antigen		15
2.3.2. Das Enzym als zentrales Element der Messreaktion		18
2.3.3. Cut-off oder Nachweisgrenze: Bewertung einer Probe		20
2.3.4. Kalibration und Eichkurve		23
2.3.5. Qualitative und semiquantitative Aussage		25
2.4. <u>Emit II, DRI und CEDIA: die Assays im Vergleich</u>		25
2.4.1. <i>Emit II</i> und <i>DRI</i> : zwei Assays mit ähnlichen Eigenschaften		25
2.4.1.1. Gemeinsamkeiten im Grundaufbau		25
2.4.1.2. Enzyme, Substrate und Puffer im Vergleich		27
2.4.2. <i>CEDIA</i> als Referenz		28
2.4.2.1. Testaufbau		28
2.4.2.2. vom Enzym zum Puffer		30

3. Drogen und ihre Metabolite: Variable zum Methodenvergleich	Seite 31
<u>3.1. Benzodiazepine, eine Gruppe von Sedativa</u>	31
3.1.1. Chemischer Aufbau und strukturelle Eigenschaften	31
3.1.2. Metabolismus: Pharmakodynamik und Pharmakokinetik	33
3.1.3. Erfassung der Metabolite: Assays im Vergleich	36
<u>3.2. Amphetamine: Drogen aus laborchemischer Produktion</u>	38
3.2.1. Chemischer Aufbau und strukturelle Eigenschaften	38
3.2.2. Metabolismus: Pharmakodynamik und Pharmakokinetik	40
3.2.3. Erfassung der Metabolite: Assays im Vergleich	43
<u>3.3. Opiate, vom chinesischen Handel zur Substitutionstherapie</u>	45
3.3.1. Chemischer Aufbau und strukturelle Eigenschaften	45
3.3.2. Metabolismus: Pharmakodynamik und Pharmakokinetik	47
3.3.3. Erfassung der Metabolite: Assays im Vergleich	49
3.3.4. Methadon als Substitutionstherapie	51
<u>3.4. Cocain, stimulierende Droge oder Lokalanästhetikum</u>	53
3.4.1. Chemischer Aufbau und strukturelle Eigenschaften	53
3.4.2. Metabolismus: Pharmakodynamik und Pharmakokinetik	54
3.4.3. Erfassung der Metabolite: Assays im Vergleich	55
<u>3.5. Cannabis: vom Anbau zum Metabolismus</u>	56
3.5.1. Chemischer Aufbau und strukturelle Eigenschaften	56
3.5.2. Metabolismus: Pharmakodynamik und Pharmakokinetik	58
3.5.3. Erfassung der Metabolite: Assays im Vergleich	59
4. Multisystemanalyser und Messprotokoll	Seite 61
<u>4.1. BM/Hitachi 911 als Multisystemanalysator</u>	61
<u>4.2. Kalibration und Kontrolle</u>	63
<u>4.3. Urinproben: von der Entnahme bis zur Messung</u>	66
<u>4.4. Drei Testverfahren in einem Messdurchlauf: das Versuchsprotokoll</u>	67

5. Ergebnisse und statistische Auswertung	Seite 68
<u>5.1. Datenerfassung</u>	<u>68</u>
<u>5.2. Qualitative und korrelative Ergebnisse</u>	<u>69</u>
5.2.1. Grundbegriffe der Statistik zum Vergleich qualitativer Daten	69
5.2.2. Kontrolle diskrepanter Ergebnisse	70
5.2.3. Korrelative Daten	71
<u>5.3. Statistische Ergebnisse der Studie</u>	<u>72</u>
5.3.1. Benzodiazepine und ihre Metabolite	72
5.3.2. Amphetamine und ihre Metabolite	75
5.3.3. Opiate und ihre Metabolite	79
5.3.4. Methadon	83
5.3.5. Cocain und Benzoylcegonin	86
5.3.6. Cannabinoide und THC	90
<u>5.4. Tabellarische Zusammenfassung der Statistik</u>	<u>94</u>
6. Diskussion	Seite 96
7. Zusammenfassung und Schlusswort	Seite 103
8. Literaturverzeichnis	Seite 104

1 Einführung in die Thematik

1.1 Notwendigkeit des Drogenscreenings

In seinen einleitenden Worten erklärte der Jugendbildungsreferent der IG Metall Marco Röhrig im Juli 2001 dass „Drogenmissbrauch ein gesellschaftspolitisches und betriebspolitisches Problem“ darstellen würde (26); ebenso zählt Deutschland ca. 250.000-300.000 Abhängige von harten Drogen wie Heroin und Kokain. Dennoch scheint ihn dies in seinen abschließenden Worten zum Drogenscreening nicht beeinflusst zu haben, als es um die Frage ging, ob Drogentests zu Einstellungsuntersuchungen in Betrieben verwendet, ja sogar gesetzlich vorgeschrieben werden sollten. Paradox beendete er seine Rede mit den Worten:

„Am Umgang der Jugendlichen mit Suchtmitteln ändern Drogentests rein gar nichts. Die IG Metall empfiehlt deshalb, alle derartigen Maßnahmen, die über die gesetzlich vorgeschriebenen Einstellungsuntersuchungen hinausgehen, abzulehnen, notfalls unter Ausnutzung der Mitbestimmungsmöglichkeiten des Betriebsrates“ (26).

Dabei sind die Zahlen der aktuellen Drogenszene in Deutschland weder zu vernachlässigen, noch im Begriff zu sinken.

Im Gegenteil: für den Freistaat Bayern (25) wurden im Jahr 2000 ungefähr 36 986 Rauschgiftdelikte gezählt, rund 7,0% mehr als im Vorjahr. Neben Konsumverstößen zählten dazu auch illegaler Besitz, Einfuhr, Anbau (...) – eine steigende Tendenz ist nicht von der Hand zu weisen.

Auch die Anzahl der Drogentoten hat in diesem Jahr im Freistaat mit 340 Opfern einen neuen Höchstwert erreicht.

Die vorausgegangenen Daten werden nicht etwa das Thema der nun folgenden Dissertation darstellen, sondern sie sollen verdeutlichen, mit welchen schwierigen Problem unsere Gesellschaft heutzutage durch die dargestellte Situation konfrontiert ist – dies gilt im übrigen nicht nur für die Bundesrepublik Deutschland. Die Bedeutung von laborchemischen Methoden nicht allein in der Aufklärung vollzogener Delikte, sondern in- folgedessen auch im Strafvollzug, bei der therapeutischen Substitution ist nicht zu unterschätzen.

1.2 Drogenscreening: klinische Chemie mit vielen Einsatzgebieten

1.2.1 Definition

Das Screening von Drogen ist definiert als die Möglichkeit, in einem zu untersuchenden Material die Präsenz gewisser Stoffe mittels einer oder mehrerer Methoden nachzuweisen. Das Screening wurde also nicht in erster Linie dafür konzipiert, in einer Probe die exakte Konzentration eines Stoffes zu ermitteln, sondern lediglich sein Vorkommen oder seine Abwesenheit festzustellen. Im Falle von spezifischen Testverfahren ist es auch möglich, eine ungefähre Einschätzung bezüglich der Konzentration des zu ermittelnden Stoffes zu geben.

Dieses Konzept der Detektion verschiedener Stoffe hat in den vergangenen Jahren an Bedeutung enorm gewonnen, selbst wenn die eingesetzten Testsysteme nur zur Ermittlung verschiedener Stoffe und selten zur exakten Bestimmung der Konzentration der gefundenen Substanzen dienen.

Sicherlich muss jedes als positiv ermittelte Resultat mindestens eine weitere Methode durchlaufen, um bestätigt oder widerlegt zu werden. Da speziell für diese Kontrolle eingesetzte Methoden sehr empfindlich sind, wird dieser Nachweis infolgedessen auch spezifischer und sensitiver ausfallen. Die Möglichkeit der Screeningverfahren, ein breites Spektrum an Substanzen mit einer kleinen Anzahl an chemischen Schritten zu erfassen, hat ihnen jedoch in den letzten Jahren zu einer stürmischen Entwicklung mit einem steigenden Kollektiv an Einsatzgebieten verholfen.

1.2.2 Einsatzgebiete von Screeningverfahren

Der „Arbeitsgruppe für Suchtstoffanalytik“ der Schweiz (AGSA) zufolge, können Immunoassays wie auch andere Verfahren zum Nachweis von Drogen eingesetzt werden. In den veröffentlichten Richtlinien zur Suchtstoffanalytik (1) unterscheidet die AGSA folgende Bereiche, in denen die Detektion von Drogen von entscheidender Bedeutung ist:

- 1) Suchtstoffanalytik für die **Differentialdiagnostik**: vor allem sind in diesem Fall Testsysteme für klinische Fragestellungen ebenso wie für die rasche Abklärung von Intoxikationen relevant, im Bereich der stationären Diagnostik und der Notfallmedizin

- 2) Suchtstoffanalytik während **Substitutions- und/oder Entzugsbehandlung** im Rahmen von Methadon- oder anderen Drogensubstitutionsprogrammen
- 3) Suchtstoffanalytik für **forensische Fragestellungen**, vor allem bei Drogen im Straßenverkehr, wie auch bei strafrechtlichem Konsum von Drogen (...)
- 4) Suchtstoffanalytik am **Arbeits-/Ausbildungsplatz**, hauptsächlich im Bereich des „Workplace testing“, bei personalärztlichen Untersuchungen, beim Militär und in der Schule.

Diese Einteilung stellt sicherlich nur einen Ausschnitt aus dem Spektrum der Screeningverfahren dar, deren Ausführung den Rahmen der hier vorzustellenden Arbeit sprengen würde. Jedoch lässt bereits hier die enorme Bandbreite feststellen, die diese Verfahren abdecken müssen.

Im Weiteren soll von der vielfältigen Nutzbarkeit dieser laborchemischen Methoden auf einen kleinen Ausschnitt fokussiert werden.

1.2.3 Wissenschaftliche Möglichkeiten der Diagnostik

Grundsätzlich gibt es eine Vielzahl an Möglichkeiten, Drogen beim Menschen nachzuweisen. Prinzipiell kann der Konsum von berauschenden Stoffen sowohl im Urin als auch in Blut, Haaren und Schweiß nachgewiesen werden.

Diese Arbeit konzentriert sich ausschließlich auf die Detektion von Substanzen im Urin, welcher ein sogenanntes „Sammelbecken für alle im Laufe eventuell zahlreicher Stunden ausgeschiedener Stoffe ist“(24). Da der Urin als Untersuchungsmaterial durch die Verfälschbarkeit von Ergebnissen (siehe Tab. 4.1 Kapitel 4.3) problematisch erscheint, können zusätzlich auch Blutproben sinnvoll sein. Bei chronischer Einnahme einer Droge kann der Nachweis auch mittels Haaruntersuchungen gelingen.

In den vergangenen Jahren wurden selbst in modernen Lehrbüchern die nun explizit zu erläuternden immunchemischen Nachweisverfahren vernachlässigt, da viele Autoren nur mit der Anwendung von chromatographischen und spektrometrischen Methoden vertraut waren (27). Dennoch zeigt sich, dass gerade durch den schnellen und unkomplizierten Einsatz, diesen Methoden heute im Bereich des Screenings der Vorzug zu geben ist. Auch die früher noch sehr verbreiteten Radioimmunoassays werden aufgrund der umfangreichen Auflagen bezüglich Radioaktivität heute weitestgehend durch nicht radioaktive Immunoassays ersetzt.

Nach den Richtlinien der AGSA (1) sollte der Einsatz dieser immunochemischen Analysensysteme nach der Art der jeweils zu testenden Droge entschieden werden. Diese Unterscheidung, wie auch die nachfolgenden Bestimmungen zur Bewertung einer Probe, sind aufgrund von politischen, wie auch medizinisch-wissenschaftlichen Grundlagen entstanden. Wie im Weiteren noch näher erläutert, unterscheidet man diesbezüglich zwischen Einzelstoffanalysen (wie den Abbauprodukten von Cannabis, Cocain, LSD, Methadon) und Stoffgruppennachweisen (wie die Metabolite von Amphetaminen, Barbituraten, Benzodiazepinen, Opiaten, ...).

Bei Ersteren könnten Immunoassays im Bereich von klinischer Differentialdiagnostik, Substitutionsprogrammen, am Arbeits-/Ausbildungsplatz und bei forensischen Fragestellungen eingesetzt werden (wobei im Bereich der Forensik der Immunoassay explizit nur als Screeningtest). Beim Methadon wird zudem darauf hingewiesen, dass in diesem Fall negative Resultate nicht unbedingt aussagekräftig sein müssen, da einzelne Vertreter der Stoffklasse, bzw. deren Metabolite nicht reagieren.

Bei den Stoffgruppenanalysen sollten Immunoassays im Bereich der Forensik ebenfalls nur als Screeningverfahren eingesetzt werden, bei den anderen Untergruppen (siehe Kapitel 1.2.2) können ähnliche Probleme wie beim Methadonnachweis auftreten und in Bezug auf die klinische Differentialdiagnostik sei darauf hingewiesen, dass aufgrund unterschiedlicher Reaktivität der Antikörper mit den verschiedenen Gruppenvertretern und deren Metabolite keine quantitative Aussage gemacht werden kann.

Diese Erläuterungen zeigen, dass auch bei breiter Einsatzmöglichkeit der Immunoassays gewisse Einschränkungen in der Beurteilung von deren Ergebnisse liegen, so dass eine Vernachlässigung dieser Tatsache sich auf das weitere medizinische, wie auch sozial oder strafrechtliche Vorgehen auswirken können.

1.3 Methoden im Vergleich: Präsentation der Dissertation

1.3.1 Vorstellung verschiedener Assays als Gegenstand der Studie

Die Enzymimmunoassays haben in der täglichen Laborchemie ihren festen Platz eingenommen. Im Vergleich zu radioaktiven Methoden ist das Prinzip dieser Enzymimmunoassays wesentlich ungefährlicher. Sie stellen eine Kombination aus Antikörper, an ihm gebundenes Enzym und Indikatorreaktion dar.

Das Thema dieser Arbeit ist der Vergleich verschiedener Enzymimmunoassays an sich. Selbst bei gleichem Detektionsprinzip unterscheiden sich die verschiedenen Enzymimmunoassays durch die Spezifität ihrer Antikörper.

Die Forschung über die Enzymimmunoassays hat in den letzten Jahren eine Vielzahl an verschiedenen Assays hervorgebracht, von denen an dieser Stelle nur zwei mit einem Referenzverfahren verglichen werden sollen: der im weiteren Verlauf als *DRI* bezeichnete Enzymimmunoassay der Firma Diagnostics Reagents Inc. und das *Emit II* Verfahren der Firma Behring. Das *CEDIA* Verfahren bildet den Kontrolltest.

Die nun folgenden Kapitel werden in einem ersten Teil erläutern, was man laborchemisch unter Enzymimmunoassay eigentlich versteht.

Des Weiteren wird beschrieben, wie man diese Assays in einem experimentellen Verfahren vergleichen kann.

Dabei sollen vor allem die Bedeutung und die verschiedenen Interpretationen bezüglich des Cut-Off-Wertes hervorgehoben werden, der Wert aufgrund dessen die Probe erst als positiv oder negativ bewertet wird.

Aus Gründen des Umfangs können jedoch nicht alle durch die Enzymimmunoassays *DRI* und *Emit II* auszutestenden Analyte behandelt werden.

Somit fokussiert das experimentelle Verfahren auf sechs verschiedene Substanzen, welche im dritten Kapitel vorgestellt werden. Es handelt sich dabei um Benzodiazepine, Amphetamine, Opiate, Methadon, Cocain und Cannabinoide. Die ersten drei Analyten bilden so genannte Substanzgruppen, welche unter die Kategorie „Gruppennachweis“ fallen, während die letzten drei Substrate als einzelne Metabolite im Urin ausgeschieden werden, einen Unterschied, dessen Bedeutung im zweiten und dritten Kapitel behandelt wird.

Besonderes Augenmerk soll bei den einzelnen Substanzen auf die Interaktion mit den verschiedenen, in dieser Dissertation verglichenen Immunoassays geworfen werden. Gerade bei Substanzgruppen werden gewisse Vertreter mehr oder weniger nachgewiesen aufgrund ihrer Affinität zum Antikörper. Diese im Weiteren noch näher erläuterte Kreuzreaktivität versucht diese Affinität von Substanz zu besagtem Antikörper zu quantifizieren und dient somit ebenso des Vergleichs der verschiedenen Assays.

Der experimentelle Teil dieser Dissertation wurde mit dem Multisystemanalyser BM Hitachi 911 durchgeführt, einem Gerät, welches in kurzer Zeit eine große Anzahl an Proben verarbeiten kann (Vorstellung im vierten Kapitel).

Um den Vergleich der zwei Assays noch durch eine dritte routinemäßig angewendete Screeningmethode zu bestätigen, wurde der *CEDIA DAU* (Cloned Enzyme Donor ImmunoAssay for Drugs of Abuse der Firma Microgenics) Assay als Kontrolle durchgeführt; die statistische Auswertung dieser Studie findet sich im fünften Kapitel dieser Arbeit.

Abschließend werden in den letzten Abschnitten die experimentellen Resultate mit der aktuellen Forschung zu diesem Thema verglichen, um die während dieser Studie eingesetzten Methoden und daraus resultierenden Ergebnisse zu diskutieren.

2 Der Enzymimmunoassay, ein standardisiertes Verfahren

2.1 Definition

Die Grundlagen eines Enzymimmunoassays (EIA) und damit seine Definition an sich liegen im Wort selber bereits vor: es geht um eine Messtechnik auf der Basis einer Immunreaktion („Immunoassay“), die gekoppelt ist mit einer enzymatischen Messreaktion. Einfacher ausgedrückt bedeutet dies, dass der Enzymimmunoassay auf einer Antigen-Antikörperreaktion beruht, wobei das Antigen den jeweils zu untersuchenden Analyten darstellt (27, 29). Koppelt man nun diesen in der Natur sehr häufig ablaufenden Prozess mit der zweiten Komponente, der Enzymreaktion – welche durch den Umsatz eines Substrates eine Farbumwandlung o.ä. in der Probe bewirkt –, so kann man infolgedessen die ablaufende Antigen-Antikörperreaktion quantitativ erfassen.

Das nun folgende Kapitel wird sich mit zwei verschiedenen Arten von Enzymimmunoassays beschäftigen und den Ablauf eines solchen Testverfahrens beschreiben – vom Antikörper bis zur Messreaktion. Des Weiteren sollen die drei verschiedenen EIA, welche dem experimentellen Aufbau dienen, vorgestellt und ihre Unterschiede erläutert werden.

2.2 Heterogene und homogene Assays

Enzymimmunoassays können in 2 verschiedene Gruppen unterteilt werden: die heterogenen und die homogenen Assays (7).

Bei den heterogenen Assays, wie dem Enzyme linked Immuno Sorbent Assay (ELISA), müssen die Antigen-Antikörper Komplexe von den freien Antikörpern in der Lösung erst getrennt oder „gewaschen“ werden, um danach die Menge an gebundenen Antikörper durch den Analyten oder die Menge an freien Antikörpern durch eine Messreaktion quantifizieren zu können. Dazu bedient sich die Laborchemie der sogenannten „solid phase“, wie bei den Radioimmunoassays verwendet, welche diese Trennung ermöglicht. Die homogenen Assays hingegen benötigen diese Trennung nicht, da das durch die Komplexbildung von Antikörper und Antigen gebundene Enzym zu einem weitgehenden Aktivitätsverlust beiträgt, was sich auf die Messreaktion entsprechend auswirkt(27). Dies setzt diesen Assays jedoch gewisse Grenzen in der Sensitivität und die verwend-

ten Antikörper müssen hochspezifisch sein, um Interferenzen in der Messreaktion zu vermeiden. Zu homogenen Assays gehören neben der Fluoreszenz Polarisation ImmunoAssay (FPIA) auch die im weiteren Verlauf verwendeten Assays wie *CEDIA*, *DRI* und *Emit II*.

Des Weiteren kann man die Enzymimmunoassays noch in kompetitive und nicht kompetitive Assays differenzieren (7).

In kompetitiven Assays (siehe Abbildung 2.1), wie *EMIT II* (entsprechend *CEDIA* und *DRI*) müssen enzymgebundenes (Dreiecke mit Kreis als Enzym) und freies Antigen (Dreieck) um die in der Anzahl limitierten Antikörperbindungsstellen konkurrieren und in einem zweiten Schritt läuft die Messreaktion (Substratumsetzung von dunklen zu hellen kleinen Kreisen) direkt über die Enzymaktivität ab, welche je nach Komplexbildung mit dem jeweiligen Antikörper mehr oder weniger inhibiert sein kann.

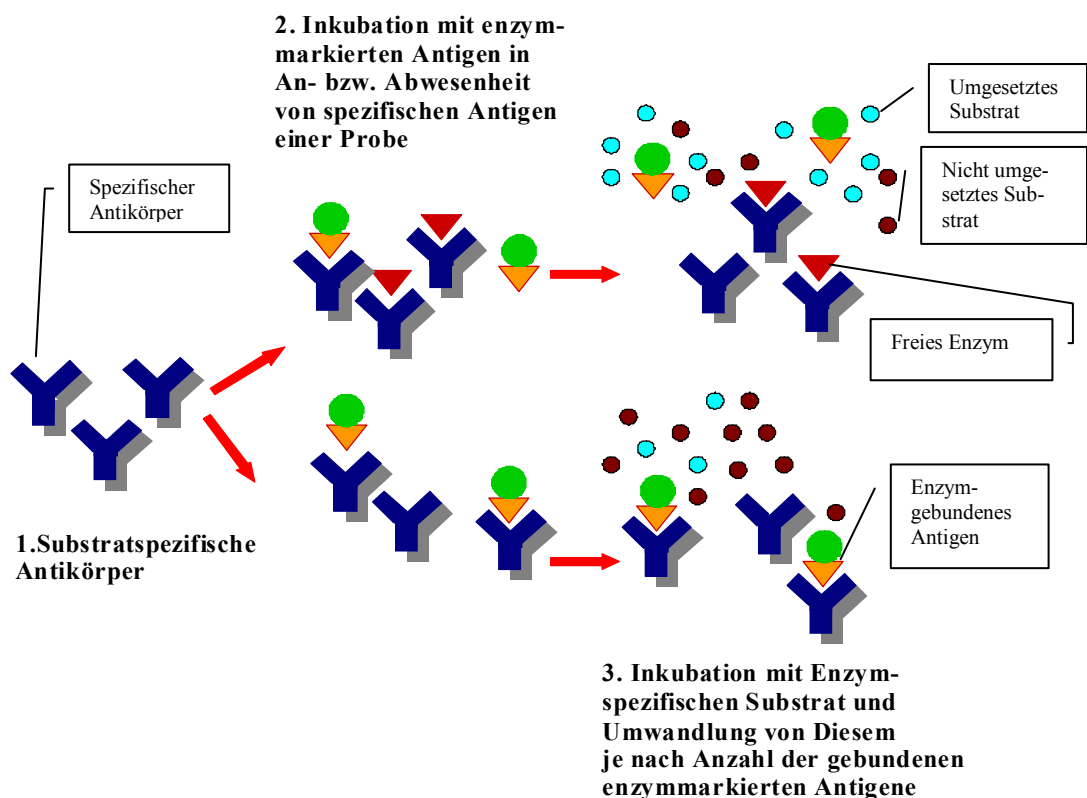


Abbildung 2.1: Darstellung des Grundprinzips eines kompetitiven Immunoassays (aus Fooley (7))

Bei den nicht kompetitiven Assays (siehe Abbildung 2.2) wird es dem Antigen (Dreieck) zuerst ermöglicht, an den Antikörper zu binden. In einem zweiten Schritt wird nach dem „Waschen“ der immobilisierte Antigen-Antikörper-Komplex mit einem

Überschuss an enzymmarkierten Antikörper (Antikörper mit Kreis als Enzym) gegen das Antigen inkubiert, dann wiederum ausgewaschen und die Messreaktion läuft am endgültig fixierten Antikörper ab.

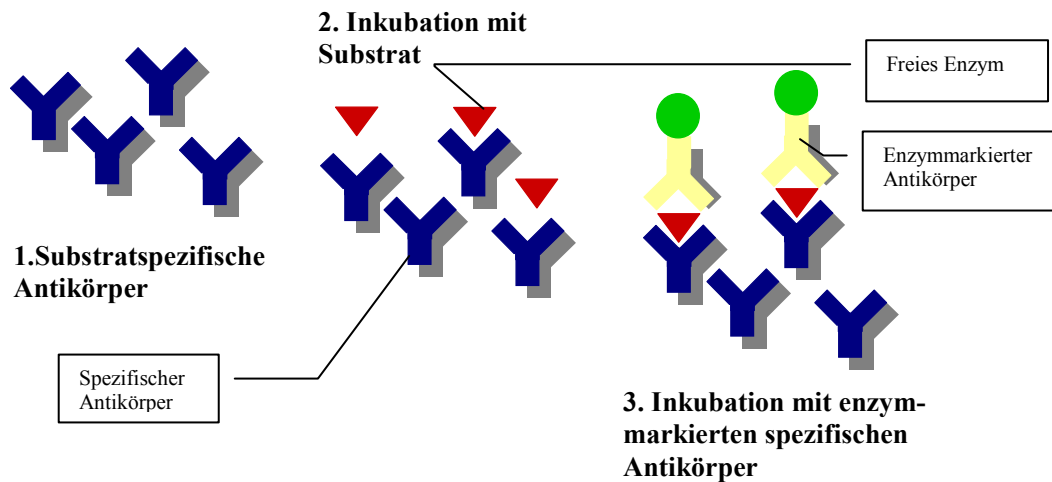


Abbildung 2.2: Darstellung des Grundprinzips eines nicht kompetitiven Immunoassays (aus Fooley (7))

Diese Technik wird auch als sogenannter „Sandwich-Assay“ bezeichnet und soll nur der Vollständigkeit halber erwähnt werden, da im weiteren Verlauf kompetitive homogene Assays besprochen werden.

2.3 Aufbau und Ablauf der verwendeten Testverfahrens

2.3.1 Antikörper, Kreuzreaktivität und Antigen

Das Kernstück der kompetitiven Immunoassays stellt die Antigen-Antikörper-Reaktion dar (27). Antikörper stellen die Antwort des Immunsystems auf eine fremde Komponente, das sogenannte Antigen dar, welches dem Organismus fremd ist und somit gebunden werden muss. Die Bildung von Antikörpern ist nur dann möglich, wenn das Antigen eine gewisse molekulare Größe besitzt, der Organismus es also erkennt und dagegen sogenannte Immunglobuline entwickelt. Sind diese einmal produziert, können sie sowohl innerhalb als auch außerhalb des Organismus die beschriebene Reaktion ablaufen lassen.

Die monoklonale Produktion von solchen Antikörpern wird für die Immunoassays in sogenannten Zellkulturen vorgenommen und ist hochspezifisch. Das heißt, dass der Antikörper nur gegen eine bestimmte Komponente des Antigens reagiert, welche auch als Determinante bezeichnet wird.

Des Weiteren besteht das Problem, dass Substanzen wie Drogen oder Medikamente, deren Konzentration mittels der EIA zu bestimmen wäre, der Klasse der niedermolekularen Moleküle angehören. Folglich würden im Organismus gegen solche Strukturen aufgrund ihres geringen Molekulargewichtes erst gar keine Antikörper produziert. Deshalb müssen sie zuerst an eine größere Trägersubstanz gekoppelt werden, wie Rinderserumalbumin, um dann vom Organismus erkannt zu werden. Nach der Antikörperproduktion reagieren diese ebenfalls gegen die niedermolekularen Substanzen, die auch als Haptene bezeichnet werden (27).

Entwickelte man einen Antikörper gegen eine spezifische chemische Struktur, wie zum Beispiel Benzoyllecgonin als Metaboliten des Cocains im Urin, so würde die anschließend ablaufende Messreaktion allein diese Substanz nachweisen. Es würde sich dementsprechend um einen „hochspezifischen Monotest“ handeln (27), wie er für das „therapeutische Drug Monitoring“ eingesetzt wird.

Da jedoch beim Drogenscreening oft sogenannte Substanzgruppen - wie z.B. Opiate oder Amphetamine - erfasst werden sollen, müssen die dafür eingesetzten Antikörper gegen chemische Komponenten gerichtet sein, welche zu den Basisstrukturen dieser Substanzen gehören. Dies ermöglicht, dass eine Probe ein breites Spektrum der zu testenden Substanzklasse erfassen kann, jedoch können auch zu der gewünschten Substanzklasse gehörenden Stoffe miterfasst werden.

Diese sogenannte Kreuzreaktivität - die Reaktion des Antikörpers mit einem ähnlichen Substrat als der Kalibratorsubstanz - stellt in erster Linie eine Ungenauigkeit der Reaktion gegenüber dem zu messenden Stoff dar, birgt jedoch Vorteile gegenüber hochspezifischen Monotests durch das Abdecken eines breiteren Spektrums an Metaboliten bei Gruppentests (21).

Die Kreuzreaktivität lässt sich mittels folgender Formel bestimmen:

Kreuzreaktivität (%)	<u>vom Gerät angezeigte Konzentration x 100</u> tatsächlich vorhandene Konzentration
-----------------------------	---

Abbildung 2.3: Formel zur Berechnung der Kreuzreaktivität (aus Schütz (27))

Diese Kreuzreaktivität ist jedoch konzentrationsabhängig und somit muss für jede dieser Berechnungen auch die Konzentration angegeben werden, bei der die Messung abgelaufen ist (27). Im dritten Kapitel soll die hier erläuterte Kreuzreaktivität dazu verwendet werden, die einzelnen Enzymimmunoassays mit einander zu vergleichen, vor allem in Bezug auf die Unterschiede in den nachzuweisenden Metaboliten.

Die zweite Komponente des ersten Reaktionsablaufes ist das Antigen, welches die Komplexbildung auslöst. In den im weiteren beschriebenen Immunoassays wird das Antigen - die zu testende Substanz - in zwei verschiedenen Formen vorliegen: frei oder enzymgebunden. Das enzymgebundene Antigen, auch als markiertes Antigen bezeichnet, ist schon vor dem Messdurchlauf im Reaktionsgemisch enthalten, bzw. es wird mit der Probenlösung gleichzeitig zugegeben.

Da sowohl das zu messende oder „freie“ Antigen wie auch das markierte für den in der Messlösung verwendeten Antikörper spezifisch sind, konkurrieren sie um dessen Bindung. Je nachdem wieviel Antigen in der Probe vorhanden sein wird, erfolgt eine mehr oder weniger quantitative Bindung des enzymmarkierten Antigens an die Antikörper. Ist die Komplexbildung erfolgt, kann das Antikörper-gebundene Enzym nicht wie im nicht komplexierten Zustand ein Substrat katalysieren, und es ergibt sich auf diese Weise das Ausmaß der eigentlichen Messreaktion (siehe Abbildung 2.1).

2.3.2 Das Enzym als zentrales Element der Messreaktion

Das Enzym ist für den zweiten Teil der Reaktion im Enzymimmunoassay, der eigentlichen Messreaktion, verantwortlich. Es setzt ein Substrat unter Umwandlung eines Co-Enzyms um. Das heißt im *Emit II* und *DRI* Verfahrens wandelt die Glucose-6-phosphatdehydrogenase unter Verwendung von Nicotinamid Adenin Dinucleotid (NAD) Glucose-6-phosphat um. NAD wird durch die Enzymreaktion zu NADH konvertiert, was spektralphotometrisch bei 340 nm eine Absorption der Probe bewirkt.

Es bleibt nun zu klären, wie die Antigen-Antikörper-Reaktion mit der Detektionsreaktion gekoppelt werden kann, um im weiteren Verlauf den Analyten in der Probe messen zu können.

Dafür gibt es je nach Enzymimmunoassay verschiedene Möglichkeiten: die einen koppeln das Enzym an sich mit dem für den Antikörper spezifischen Antigen. Dadurch konkurrieren Antigen, markiertes Enzym und Analyt in der Probe um die Bindungsstellen am Antikörper: im Falle, dass kein Analyt in der Probe vorhanden ist, wird enzymmarkiertes Antigen an den Antikörper gebunden und somit die Funktion des Enzyms durch die Komplexbildung so reduziert, dass es keine oder kaum eine Farbänderung bewirkt. Ist dies nicht der Fall, so bleibt das Enzym frei in der Probenlösung, die enzymatische Reaktion läuft uneingeschränkt ab und bewirkt die Farbänderung (zum Beispiel *Emit II* Verfahren (7,14)).

Andere Enzymimmunoassays, wie das *CEDIA* Verfahren, enthalten das Enzym in gespaltenen Form. An einem der zwei Teile wird das mit dem Analyten in der Probe konkurrierende Antigen fixiert; bei Ablauf der Reaktion wird das antigenmarkierte Enzymteil in Abwesenheit des Analyten durch seine Bindung mit dem Antikörper nicht mit dem zweiten Teil des Enzyms fusionieren und daher keine Reaktion katalysieren. Ist Analyt in der Probe vorhanden, so fügen sich die ungebundenen Enzymteile zusammen und die katalytische Reaktion kann ablaufen (17).

Bei oben genannten Methoden ist durch definierte Konzentrationen von Antikörper und enzymmarkiertem Antigen die Farbänderung proportional zur dem in der Probe vorhandenen Antigen, bzw. Analyten.

Neben Glucose-6-phosphatdehydrogenase gibt es noch andere Enzyme wie β -Galactosidase, Lactamase oder Urease, welche solche enzymatische Prozesse katalysie-

ren können. Entscheidend für die Auswahl des Enzyms sind verschiedene Eigenschaften, welche in folgender Tabelle kurz zusammengefasst werden (7).

- **Schnelle Konjugation**
- **Hohe Umsatzrate**
- **Stabilität in der Lösung**
- **Umsatz eines stabilen Substrates**
- **Gute Verfügbarkeit und preisgünstig**

Tab. 2.1: Charakteristika von Enzymen in Immunoassays (aus Fooley (7))

2.3.3 Cut-Off oder Nachweisgrenze: Bewertung einer Probe

„Der Cut-off-Wert ist definiert als eine Zahlengröße, z.B. Konzentrationseinheit oder dimensionslose Zahl, unterhalb der ein Analysenresultat als negativ angesehen wird, während ein Wert oberhalb des Cut-off die Bewertung positiv erhält“ (27).

Diese Definition ist folgendermaßen zu interpretieren: der Cut-off stellt eine Entscheidungsgrenze dar, welche sowohl durch analytische als auch durch medizinische Überlegungen festgelegt sein kann. Ein negatives Ergebnis nach Vergleich mit dem Cut-off bedeutet nicht, dass in dieser Probe kein Analyt enthalten ist.

Dies bedeutet, dass ein Assay neben einem Cut-off-Wert auch noch eine sogenannte Nachweisgrenze besitzt: die definiert die Konzentration an Analyten, welche gerade noch durch den Assay nachgewiesen werden kann. Laboranalytisch verhält es sich so: würde man den Cut-off der Nachweisgrenze nähern, so würde die Zahl positiver Ergebnisse zunehmen, jedoch besteht dabei die Gefahr, durch Bestimmung anderer nicht spezifischer Metabolite eine erhöhte Rate an falsch-positiven Proben zu erhalten. Das Vertrauen in die Methode, die sogenannte Konfidenz, würde abnehmen. Wählt man den Cut-off zu hoch, so erhöht man zwar die Spezifität des Assays, jedoch würde man nur ein gewisses Kollektiv selektieren und eine hohe Anzahl falsch-negativer Befunde erhalten.

Auch drogenpolitisch gesehen zeigt sich die Wahl des Cut-off-Wertes von großer Bedeutung. Hinsichtlich der Einnahme von Substanzen, die eine Einschränkung der Konzentrationsfähigkeit bewirken, ist gerade im verkehrsmedizinischen Bereich auch auf kleine Konzentrationen zu achten. Daher müsste der Cut-Off auf niedrige Werte festgesetzt werden. Bei Nachweis von akutem Konsum von Drogen ist ein niedriger Cut-off jedoch gerade hinderlich, da bei Stoffen mit langer Halbwertszeit sich selbst dann ein positiver Nachweis ergeben kann, wenn der Konsum bereits einige Zeit zurückliegt und der zu begutachtende Patient in dieser Zeit nicht mehr konsumiert hat.

Dies soll verdeutlichen, dass im weiteren Verlauf festgelegte Cut-Off-Werte keine Aussage über Präsenz oder Abwesenheit von Drogen in der Probe machen können, sondern lediglich das Entscheidungskriterium darstellen, ab welchem Wert die Probe als positiv bewertet und infolgedessen auch einem Bestätigungstest zugeführt wird.

In folgender Tabelle wird eine Übersicht der in der Dissertation getesteten Drogen und der verwendeten Cut-Off-Werte gegeben, welche vom jeweiligen Hersteller und dem National Institute of Drugs of Abuse (NIDA), oder neuerdings SAMHSA (U.S. Substance Abuse and Mental Health Services Administration) genannt, für die hier verwendeten Enzymimmunoassays CEDIA, DRI und Emit II empfohlen werden.

Substanzen/-klassen	Cut-off Konzentrationen im Urin (ng/ml)
Benzodiazepine	300
Amphetamine	1000 (ggf. auch 300,500)¹
Opiate	300
Methadon	300
Cocain	300
Cannabinoide (THC-COOH)	50 (ggf. 20)¹

Tab. 2.2: Cut-off Empfehlungen der SAMHSA für das Drogenscreening im Urin mittels Immunoassays²

¹ Diese Schwellenwerte sind abweichend von den Empfehlungen der SAMHSA in der Literatur und den Herstellerinformationen als mögliche Entscheidungsgrenzen angegeben (12, 13, 14, 28); diese Tatsache, welche für die Wertung von Urinproben von entscheidender Bedeutung ist, wird im weiteren Verlauf dieser Dissertation noch eingehender beschrieben.

² Die hier aufgeführte Tabelle stellt nur eine Auswahl der von der SAMHSA veröffentlichten Empfehlungen zum Drogenscreening dar, jedoch sind die hier aufgeführten Substanzen/-klassen im Rahmen der beschriebenen Studie hauptsächlich relevant.

Zur selben Thematik geben die Richtlinien der AGSA (1) ebenfalls folgende Empfehlungen ab, welche die Entscheidungsgrenze jedoch von den jeweiligen Einsatzbereichen der EIA abhängig machen (siehe folgende Tabelle).

Substanzen/-klassen	Suchtstoff-Analytik zur Differential-Diagnostik bei klinischer Fragestellung	Suchtstoff-Analytik bei Substitutions- oder Entzugs-Therapie	Suchtstoff-Analytik bei forensischen Fragestellungen	Suchtstoff-Analytik am Arbeits-/ Ausbildungsplatz
Benzodiazepine	S	100	X	-
Amphetamine	S	300	X	1000
Opiate	S	300	X	2000
Methadon	S	200	X	-
Cocain	S	200	X	300
Cannabinoide (THC-COOH)	S	50	X	50

Tab. 2.3: AGSA empfohlene Cut-off-Konzentration für instrumentelle immunochemische Verfahren (ng/ml) für Urine ohne vorherige Hydrolyse (1)

Wie hierbei ersichtlich, empfiehlt die AGSA für den Bereich der klinischen Fragestellung die Sensitivitätsgrenze (=S) als Cut-off-Wert zu verwenden, bei forensischen Fragestellungen werden keine Empfehlungen gegeben (=X) und in Bezug auf das Drogenscreening am Arbeitsplatz gibt es bezüglich Benzodiazepine und Methadon keine Aussagen.

Diese Darstellungen sollen abermals verdeutlichen, dass die Wahl des Cut-off-Wert weniger eine wissenschaftliche, sondern vielmehr eine situationsbedingte Entscheidung ist, welche je nach Einsatzbereich der Suchtstoffanalytik variieren kann. Demnach muss der EIA nicht nur aufgrund seiner Eigenschaften, sondern ebenso nach der Frage, wofür er eingesetzt wird, bewertet werden.

Für die hier untersuchte Gegenüberstellung der drei EIA *CEDIA*, *DRI* und *Emit II* werden die Empfehlungen der SAMSHA wie in Tabelle 2.2 zugrunde gelegt.

2.3.4 Kalibration und Eichkurve

Die Durchführung der Messung eines Analyten setzt voraus, dass der verwendete Assay auf dem einzusetzenden Analysegerät kalibriert wird. Ziel dieser Vorbereitung ist das Erstellen einer Eichkurve.

Für dieses Vorgehen werden mit den Reagenzien auch sogenannte Kalibratoren mitgeliefert, welche definierte Konzentrationen des zu bestimmenden Analyten enthalten. Je nach verwendetem Assay gibt es eine unterschiedliche Zahl von Kalibratoren, wovon zwei immer enthalten sein müssen: der Kalibrator für den Null-Wert und der für den Cut-off-Wert.

Das verwendete Gerät, in diesem Fall der BM Hitachi 911 Multisystemanalyzer, teilt dem jeweiligen Kalibrator nach dem Ablauf der Messreaktion ein Messsignal zu, einen Messwert der Absorption, welcher der Konzentration des in der Probe enthaltenen Analyten entspricht. Werden die Konzentrationen gegen die spektralphotometrischen Messwerte in ein Diagramm eingetragen, so erstellt sich das Gerät damit eine Eichkurve. Werden nun Urinproben getestet, so wird der ermittelte photometrische Wert mit dieser Kurve verglichen und daraus die Konzentration des jeweilig zu bestimmenden Analyten in der Probe abgeleitet.

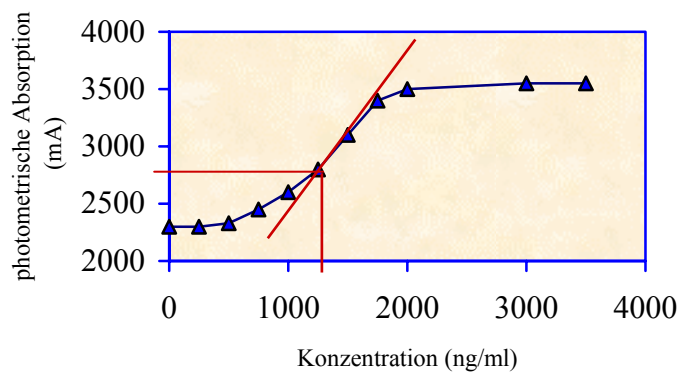


Abbildung 2.4: Exemplarische Eichkurve eines Enzymimmunoassays³

³ Die dargestellte Abbildung zeigt beispielhaft die Beziehung zwischen der Konzentration der Kalibratoren oder im weiteren Verlauf zu testenden Substanzen und deren respektiven Extinktionen, photometrisch gemessen. Die Kurve, entstehend aufgrund der Kalibration mit definierten Konzentrationen der Substanz, gibt im Verlauf einen Scheitelpunkt wieder (in dem die rote Tangente die Kurve schneidet), in dessen unmittelbaren Bereich Extinktionsschwankungen am präzisesten eine Aussage über die Konzentrationsänderungen treffen können. Die im Scheitelpunkt determinierte Konzentration wird deshalb meist als Cut-off-Wert verwendet (hier würde der Cut-off 1250 ng/ml entsprechen bei einer Extinktion von 2800 mÅ).

Es sei dem noch hinzufügen, dass die Eichkurve an sich über die Genauigkeit und die Präzision der Messung entscheidet – vor allem im Intervall um den Cut-off. Je steiler die Kurve in diesem Bereich, desto präziser werden Änderungen der Extinktionswerte sich in der Konzentrationsänderung bemerkbar machen. Ist die Eichkurve in diesem Bereich eher abgeflacht, so bewirken erst größere Änderungen im photometrischen Bereich eine wahrnehmbare Konzentrationsänderung.

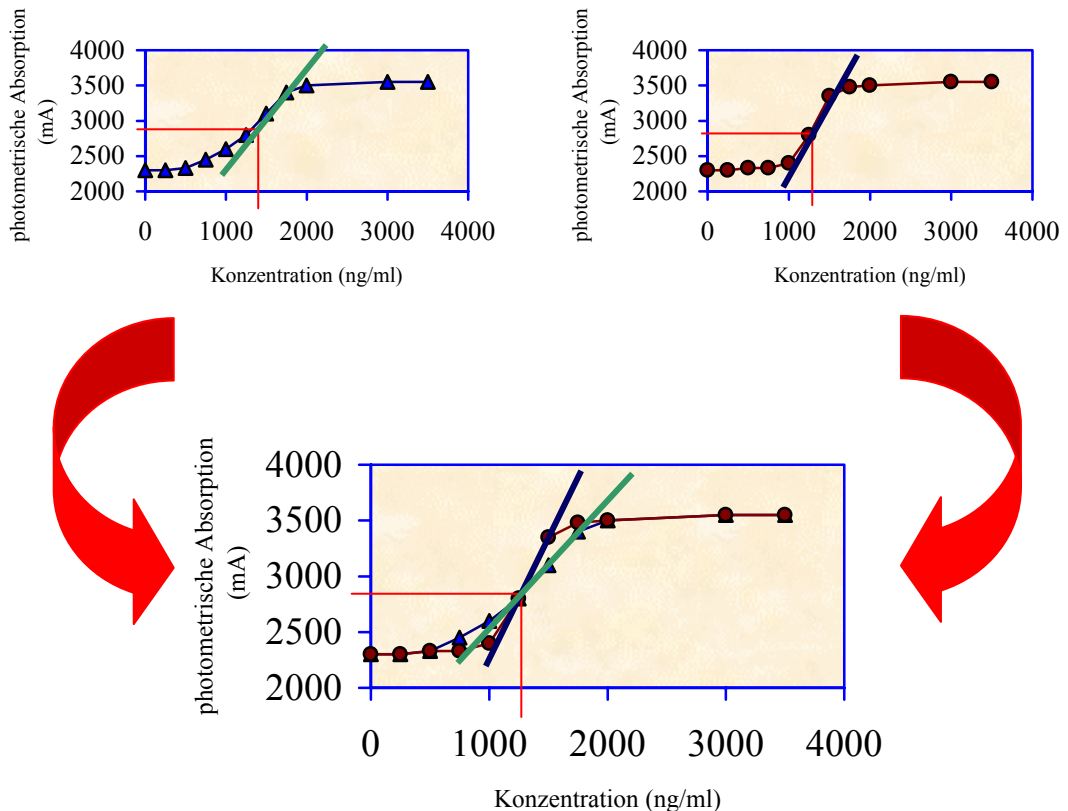


Abbildung 2.5: Vergleich von zwei verschiedenen Eichkurven unterschiedlicher Steilheit⁴

⁴ Die dargestellte Abbildung versucht, zwei unterschiedliche Eichkurven beispielhaft gegenüber zu stellen (Diagramme rechts und links oben in der Abbildung). Da der Verlauf der Eichkurve im Scheitelpunkt (Dieser wird vorzugsweise auch als Cut-off-Wert verwendet) für die Präzision um die Entscheidungsgrenze von einschlägiger Bedeutung ist (siehe Abbildung 2.4), ergeben sich Unterschiede im Messverhalten der Assays allein durch den Eichkurvenverlauf. Durch die Tangenten, welche in den oberen zwei Diagrammen in den Scheitelpunkten die Kurven schneiden, wird das Ausmaß der Steilheit nochmals verdeutlicht, so auch im Summationsdiagramm (Diagramm unterhalb der ersten zwei Kurven), wo der Winkel zwischen den Tangenten die differierende Steilheit hervorhebt.

2.3.5 Qualitative und semiquantitative Aussage

Da dieses Thema später noch eingehend behandelt wird (siehe Kapitel 5.2), soll im Zuge der allgemeinen Darstellung des Enzymimmunoassay nur kurz darauf eingegangen werden. Enzymimmunoassays liefern im Rahmen eines Screening prinzipiell qualitative Ergebnisse. Dies bedeutet, dass sie durch den Cut-off-Wert im Bezug auf eine zu analysierende Probe die Entscheidung zwischen positiven und negativen Ergebnis getroffen sind.

Fixiert man vor Messbeginn einen Schwellenwert - wie hier den Cut-off -, so werten die eingesetzten Assays die untersuchten Proben nach diesem Kriterium aus.

Da sie dies mittels einer Eichkurve und daraus abzuleitenden Konzentrationsangaben tun, könnte man in Erwägung ziehen, diese Werte als quantitative Angaben zu betrachten und somit das Ausmaß des Konsums zu bewerten.

Aus der Literatur geht jedoch hervor, dass Enzymimmunoassays sich nicht oder nur teilweise für diese Art der Auswertung eignen, da es sich bei den meisten für das Drogenscreening verwendeten Assays um Gruppentests handelt. Deshalb muss eine Bestätigungsanalyse durchgeführt werden, um den exakten Wirkstoff zu identifizieren und zu quantifizieren. Selbst wenn es sich um einen Monotest handelt – wie oben bereits erwähnt das Benzoylcegonin als Metaboliten des Cocains im Urin –, so hängt die Präzision immer noch von der Eichkurve ab, welche bei höheren Werten flacher wird. Auch stößt der EIA hier an seine Grenzen und wird ein Ergebnis, was über den höchsten Kalibrator hinausgeht, nicht mehr erfassen können, und somit ist eine semiquantitative Bewertung – wenn überhaupt – nur im Bereich zwischen dem Cut-Off-Wert und den jeweiligen Grenzkalibratoren möglich.

2.4 *Emit II, DRI und CEDIA: die Assays im Vergleich*

2.4.1 *Emit II* und *DRI*: zwei Assays mit ähnlichen Eigenschaften

2.4.1.1 Gemeinsamkeiten im Grundaufbau

Die beiden Enzymimmunoassays *DRI* und *Emit II*, welche im weiteren Verlauf hinsichtlich ihrer qualitativen und teilweise korrelativen Aussagekraft verglichen werden, sind in ihrem Grundaufbau - wie bereits erwähnt - praktisch identisch (siehe Abbildung 2.6).

Es handelt sich dabei um zwei homogene kompetitive Enzymimmunoassays, wobei der zu bestimmende Analyt mit einem Glucose-6-phosphat-dehydrogenase-(G-6-PDH)-markierten Antigen um die Bindungsstelle konkurriert. Bindet das enzymmarkierte Antigen an den Antikörper - mangels nachzuweisendem Analyt in der Probe - so nimmt die Aktivität der G-6-PDH ab. Ist dies nicht der Fall, so setzt sie das Substrat Glucose-6-phosphat mit Hilfe von NAD als Coenzym um, welches infolgedessen in NADH umgewandelt wird. Diese Transformation von NAD zu NADH bewirkt die Änderung der Absorption bei 340 nm. Dieses Phänomen weist eine direkte Proportionalität zwischen der Enzymaktivität und der Konzentration an Analyten in der Probe auf (7, 13, 14). Im Hinblick auf die etwaige Beeinflussung der G-6-PDH im Serum durch das endogene Enzym weist der Hersteller des *Emit II* Assays noch darauf hin, dass es sich beim verwendeten Enzym um ein bakterielles Enzym handelt (aus *Leuconostoc mesenteroides*), mit dem allein das Coenzym reagieren kann.

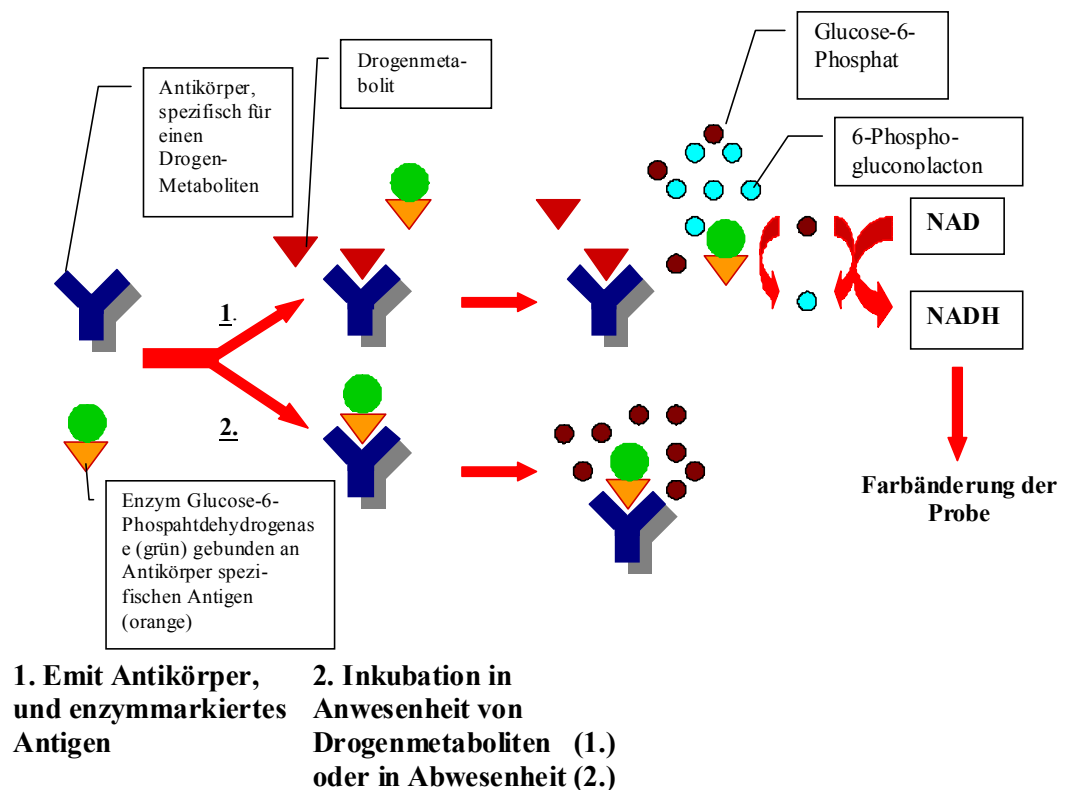


Abbildung 2.6: Grundaufbau des *Emit II* Enzymimmunoassay (aus Fooley(7))

2.4.1.2 Enzyme, Substrate und Puffer im Vergleich

Wie bereits beschrieben verwenden beide Systeme, *DRI* und *Emit II*, identische Enzyme um die Messreaktion zu katalysieren. Anhand folgender Tabelle soll dargestellt werden, welche Substrate und Puffer die beiden Systeme verwenden, wobei die genaueren Konzentrationen der verwendeten Puffer, Enzyme genauso wie die Art der Antikörper oder der Konservierungsstoffe nicht in den Angaben des Herstellers verzeichnet waren.

Reagenzien	DRI	Emit II
Antikörper /Substrat Reagenz	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Metabolit spezifische Antikörper ➤ Glucose-6-phosphat ➤ Nicotinamid-adenin Dinucleotid ➤ Tris Puffer und Natriumazid als Konservierungsstoffe 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Metabolit spezifische Antikörper ➤ Glucose-6-phosphat ➤ Nicotinamid-adenin Dinucleotid ➤ Füllstoffe, Stabilisatoren
Enzym-Reagenz	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Glucose-6-phosphat-dehydrogenase markierter spezifischer Metabolit ➤ Tris Puffer und Natriumazid als Konservierungsstoffe 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Glucose-6-phosphat-dehydrogenase markierter spezifischer Metabolit ➤ Füllstoffe, Stabilisatoren

Tab. 2.4: Vergleich der Reagenzien von *Emit II* und *DRI* nach Herstellerangaben (13, 14)⁵

⁵ Der Tabelle 2.4 sei noch hinzu zu fügen, dass der *Emit II* Assay in manchen Testlösungen ebenso Natriumazid verwendet, was jedoch vom Hersteller jedoch nur im Rahmen des Opiat-Test explizit erwähnt wurde. Der *DRI* Assay hingegen verwendet die oben genannten Komponenten in allen Assays.

Im Hinblick auf die im Weiteren zu analysierenden Drogen findet sich in folgender Tabelle eine Darstellung von Substanzen/-gruppen und deren Metabolite, gegen die Antikörper der beiden EIA gerichtet sind.

Substanzen/-gruppen	DRI	Emit II
Benzodiazepine	Oxazepam	Diazepam (Schaf-AK)
Amphetamine	d-Amphetamin d-Methamphetamin	d-Amphetamin (Maus-AK) d-Methamphetamin (Maus-AK)
Opiate	Morphin	Morphin (Schaf-AK)
Methadon	Methadon	Methadon (Schaf-AK)
Cocain	Benzoyllecgonin	Benzoyllecgonin
Cannabinoide	Δ-9-THC-COOH	Δ-9-THC-COOH (Maus-AK)

Tab. 2.5: Vergleich der Substanzen, gegen die Antikörper der beiden Assays entwickelt wurden (nach Herstellerangaben (13, 14))

2.4.2 *CEDIA* als Referenz

2.4.2.1 Testaufbau

Das *CEDIA* System, der **Cloned Enzyme Donor Immuno Assay**, unterscheidet sich von oben genannten Testverfahren entscheidend, weshalb es sich als Kontrollverfahren in dieser Studie als sehr geeignet erwies. Es handelt sich beim *CEDIA* um einen Assay, der rekombinante DNA-Technik verwendet (19). Im Gegenteil zu *DRI* und *Emit II* verwendet dieser Test β -Galactosidase als Enzym, das gentechnologisch in zwei Fragmente gespalten wurde (siehe dazu Abbildung 2.7).

Diese beiden Fragmente - in einer Lösung der Enzymdonor (ED); in der anderen der Enzymakzeptor (EA) - erweisen sich einzeln als vollkommen enzymatisch inaktiv. Treffen diese Fragmente aufeinander, so rekombinieren sie und katalysieren die enzymatische Reaktion.

Da beim *CEDIA* der Enzymdonor mit einem Antigen gekoppelt ist, kann er mit dem zu messenden Analyten in der Probe um den spezifischen Antikörper konkurrieren.

Bindet der ED an den Antikörper, so verhindert dies die Rekombination mit dem zweiten Fragment, dem EA, und die enzymatische Katalyse kann nicht ablaufen. Im Fall,

dass genügend Analyt vorhanden ist, nimmt die Komplexbildung von markierten ED mit dem Antikörper ab, EA und ED rekombinieren, und das Enzym wird funktionsfähig. Daraufhin wird das Substrat Chlorphenolrot-β-D-galactopyranosid direkt umgesetzt und die Farbreaktion gemessen (17, 19, 20).

Die Konzentration des in der Probe vorhandenen Analyten ist somit wie bei den anderen zwei EIA's ebenfalls proportional zur Enzymaktivität und dementsprechend zur Farbänderung. Die spezielle Eigenschaft des *CEDIA* Verfahrens besteht somit in der Rekombination des Enzyms (im Gegensatz zu *DRI* und *Emit II*) wie auch in der Umsetzung eines Substrates, welches direkt eine Farbänderung bewirkt und zu dem kein Coenzym als Indikatorreaktion benötigt wird.

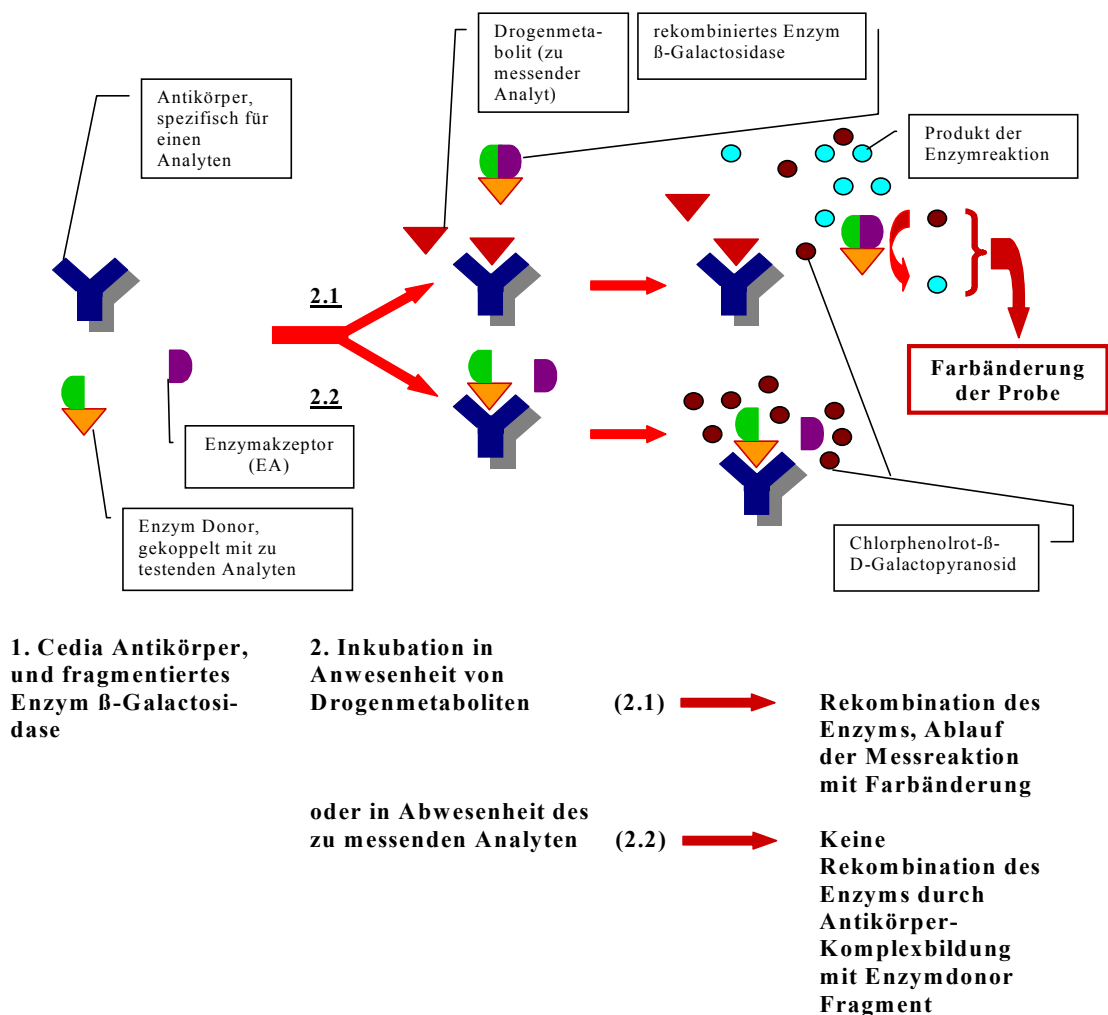


Abbildung 2.7: Grundaufbau des *CEDIA* Enzymimmunoassay

2.4.2.2 vom Enzym zum Puffer

Der Unterschied des *CEDIA* Verfahren zu den anderen beiden soll kurz anhand folgender Tabelle der verwendeten Reagenzien im Testablauf dargestellt werden.

CEDIA Enzymakzeptor (EA) Reagenz	CEDIA Enzymdonor (ED) Reagenz
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Monoklonale wie polyklonale Antikörper vom Schaf oder Maus ➤ Enzymakzeptor (mikrobiell) ➤ Piperazin-N,N-bis(2-Ethansulphon-Säure)-Puffer ➤ Puffersalze, Stabilisator, Detergens und Konservierungsmittel 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Enzymdonor (mikrobiell) gekoppelt an den zu analysierenden Metaboliten ➤ Chlorphenolrot-β-D-Galactopyranosid ➤ Piperazin-N,N-bis(2-Ethansulphon-Säure)-Puffer ➤ Puffersalze, Stabilisator und Konservierungsmittel

Tab. 2.6: Darstellung der Reagenzien des *CEDIA* Immunoassay (nach Herstellerangaben (12))

Im Hinblick auf die im Weiteren zu analysierenden Drogen findet sich in folgender Tabelle eine Darstellung von Substanzen/-gruppen und deren Zielsubstanz, gegen die Antikörper des *CEDIA* Assays gerichtet sind.

Substanzen/-gruppen	CEDIA
Benzodiazepine	Nitrazepam (Schafpolyklonale AK)
Amphetamine	d-Amphetamin d-Methamphetamin
Opiate	Morphin
Methadon	Methadon (Maus-AK)
Cocain	Benzoylcegonin
Cannabinoide	Δ-9-THC-COOH

Tab. 2.7: Vergleich der Substanzen, gegen die Antikörper des *CEDIA* Assay entwickelt wurden (nach Herstellerangaben (12))

Zusammenfassend kann man sagen, dass die verwendeten Verfahren, DRI und Emit II, große Ähnlichkeiten im Grundaufbau aufweisen. Das *CEDIA* System unterscheidet sich von ihnen aufgrund seiner rekombinanten DNA-Technik und bietet somit einen guten Kontrolltest.

3 Drogen und ihre Metabolite: Variable zum Methodenvergleich

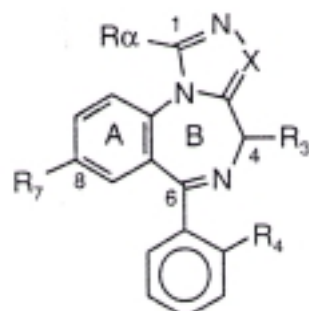
In diesem Kapitel sollen die zu untersuchenden Substanzen hinsichtlich ihrer chemischen und pharmakologischen Wirkungsweise besprochen werden. Dafür wurden folgende Werke als Quellen verwendet, die nicht mehr ausdrücklich zitiert werden: The forensic pharmacology of Drugs of Abuse (Drummer O.H., Odell M (5)), Drogen und Psychopharmaka (Julien R.M. (18)), Herstellerinformationen zu *CEDIA*-, *DRI*-, *Emit II*-Verfahren bezüglich Testverfahren, Reagenzien, Prinzip, Ergebnisse, Leistung für die Substanzklassen der Benzodiazepine, Amphetamine, Opiate, Methadon, Cocain und Cannabinoide (12, 13, 14) und die AGSA Richtlinien (1).

3.1 Benzodiazepine, eine Gruppe von Sedativa

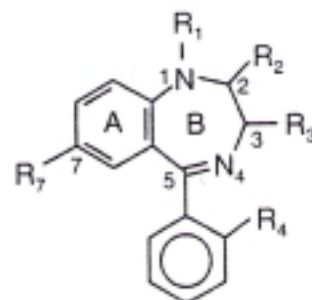
3.1.1 Chemischer Aufbau und strukturelle Eigenschaften

Benzodiazepine gehören zur Gruppe der meist verschriebenen Medikamente und besitzen neben sedativen auch hypnotische, anxiolytische, antikonvulsive und muskelrelaxierende Fähigkeiten. Sie werden vornehmlich in der antiepileptischen Therapie, sowie in Anästhesie und Psychiatrie verwendet. Es gibt weltweit mindestens 50 verschiedene Substanzen dieser Stoffgruppe; allen gemeinsam ist eine zentral dämpfende Komponente, welche durch Förderung des GABA Neurotransmitter am Rezeptor (**Gamma-Aminino-Buttersäure**) hervorgerufen wird.

Die Grundstruktur der Benzodiazepine - wie auch aus Abbildung 3.1 ersichtlich - besteht aus der Fusion eines Benzen-Ringes (Ring A) mit einem Diazepin-Ring (Ring B).



Diazolo (X=C) und triazolo (X=N) 1,4-Benzodiazepine



1-Alkyl (aryl)-substituiertes-1,4-Benzodiazepin

Abbildung 3.1: Grundstruktur der Benzodiazepine (aus Drummer (5))

Die Struktur, im weiteren als Benzodiazepin bezeichnet, enthält in der ersten und vierten Position eine Stickstoffverbindung; alle weiteren Derivate der Benzodiazepine besitzen die gleiche Grundstruktur, unterscheiden sich jedoch durch Substituenten an den Positionen R1 bis R7.

Durch diese Endgruppen werden den verschiedenen verwandten Substanzen unterschiedliche pharmakologische Eigenschaften und Nebenwirkungen zugeordnet.

Diazolo- und Triazolgruppen der Benzodiazepine unterscheiden sich von der Diazepam ähnlichen Gruppe durch ein weiteres Ringsystem in den Positionen 1 und 2 des Benzodiazepinkerns (siehe Abbildung 3.2 und 3.3), welche diesen Präparaten (wie z.B. Triazolam) besondere Eigenschaften verleihen, welche jedoch nicht im weiteren erläutert werden sollen.

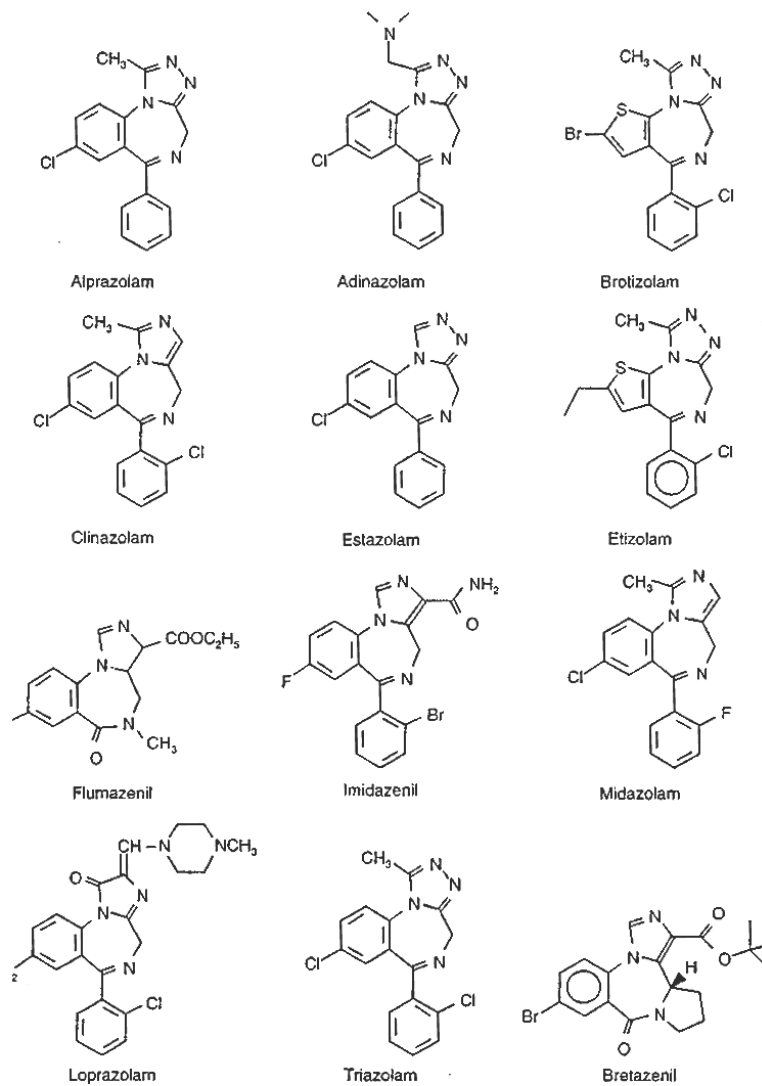


Abbildung 3.2: Auswahl von Diazolo- und Triazolobenzodiazepine (aus Drummer (5))

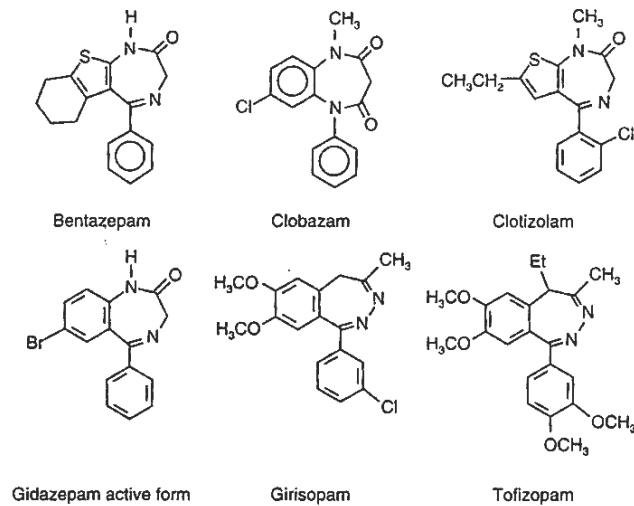


Abbildung 3.3: Auswahl gemischter Benzodiazepinstrukturen (aus Drummer (5))

3.1.2 Metabolismus: Pharmakodynamik und Pharmakokinetik

Die Benzodiazepine erlangen eine gute Resorption nach oraler Einnahme und können Höchstdosen bereits in der ersten Stunde erreichen. Dennoch können Bioverfügbarkeit, Halbwertszeit und Ausscheidung je nach Wirkstoff diverse Unterschiede aufweisen.

Im Prinzip erfolgt die Metabolisierung der Benzodiazepine aufgrund von Desalkylierung, Hydroxylierung, Oxidierung und Glucuronidierung (siehe Abbildung 3.4).

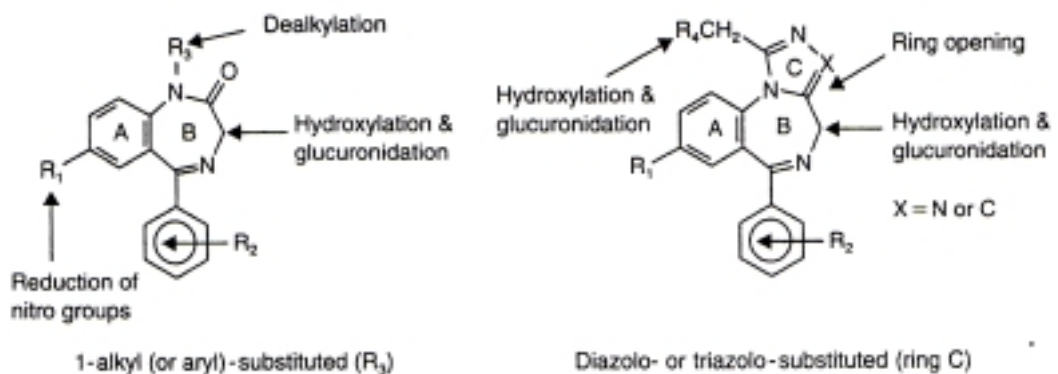


Abbildung 3.4. Schematische Metabolisierung von 1,4-Benzodiazepinen (aus Drummer (5))

Die 1,4-Benzodiazepine (wie z.B. Diazepam, Chlordiazepoxid) werden anfänglich desalkyliert, oxidiert und hydroxyliert und dadurch entstehen im folgendem die Hauptmetaboliten Nordiazepam und Oxazepam, die infolge einer 3-Hydroxylierung als Glucuronide über die Niere ausgeschieden werden können (siehe Abbildung 3.5).

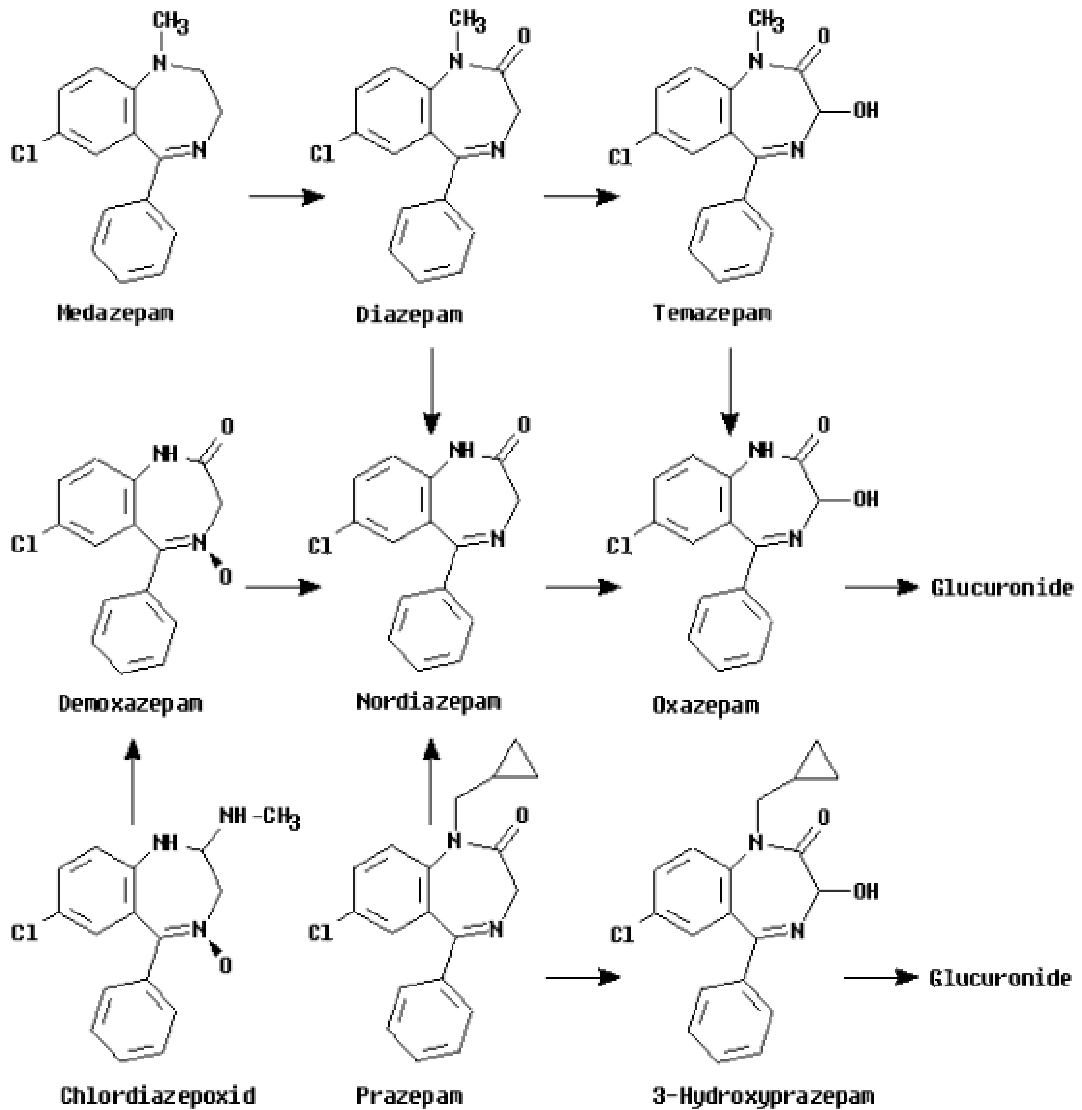


Abbildung 3.5: Metabolismus der 1,4 Benzodiazepine (1)

7-Nitrobenzodiazepine hingegen (wie Flunitrazepam z.B.) werden durch Reduktion der 7-Aminoverbindungen, N-Acetylierung, N-Demethylierung, 3-Hydroxylierung und daraufhin Glucuronidierung renal ausgeschieden (siehe Abbildung 3.6). Dabei sei anzumerken, dass die unveränderte Ausscheidung von Flunitrazepam nur weniger als 1% repräsentiert.

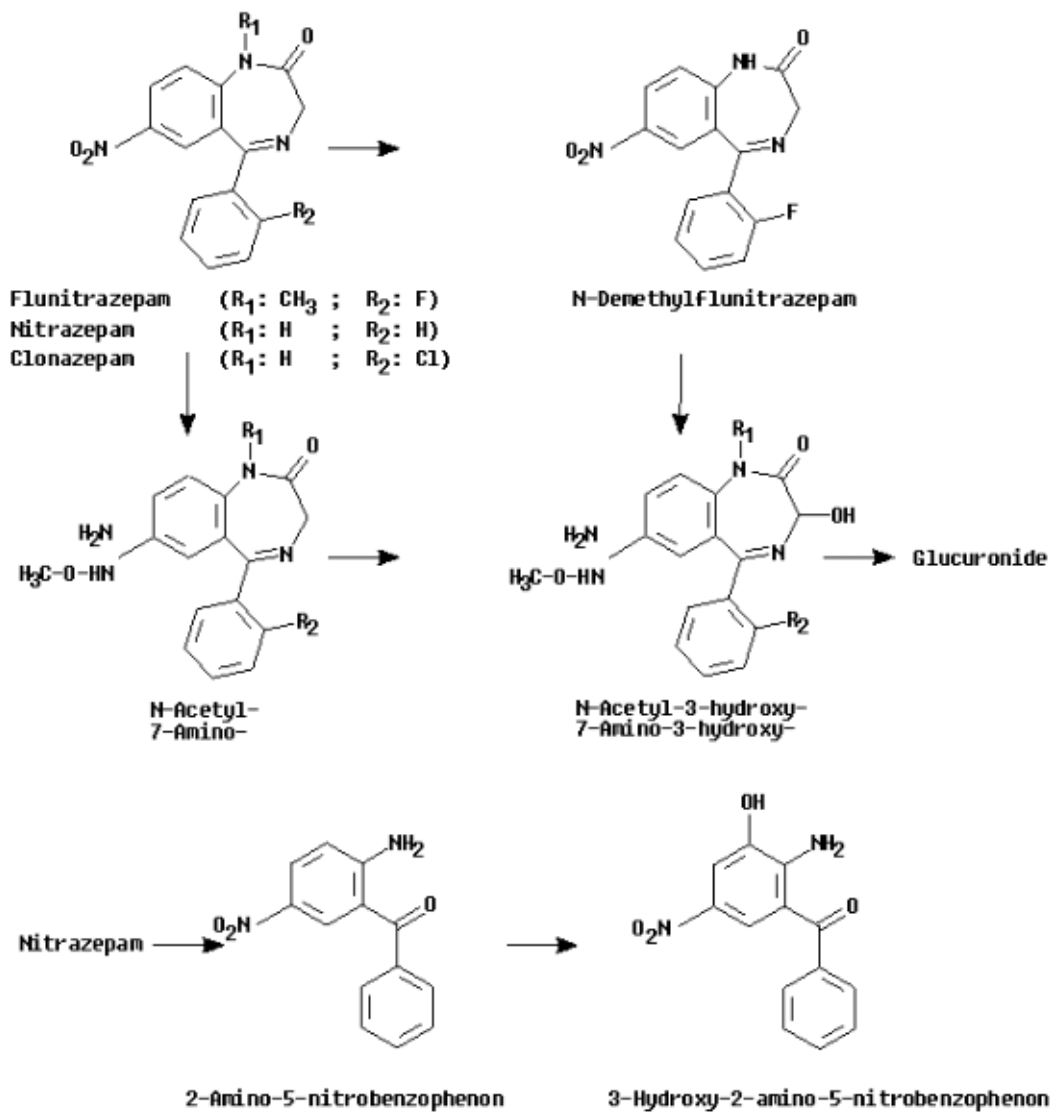


Abbildung 3.6: Metabolismus der 7-Nitrobenzodiazepine (1)

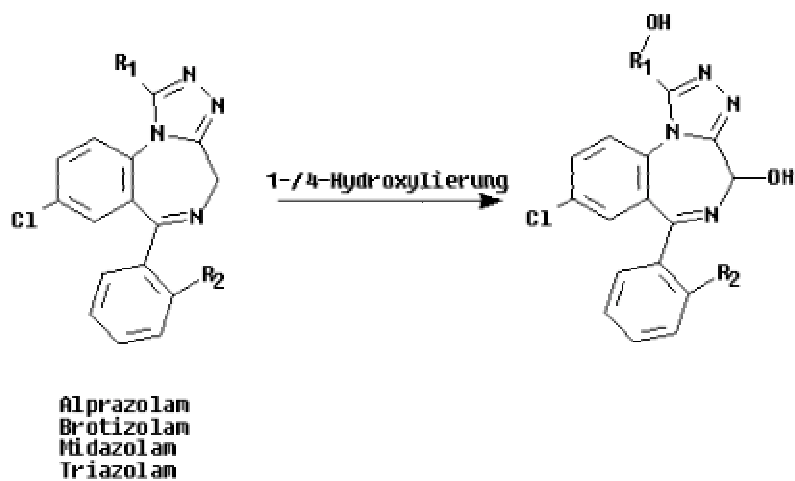


Abbildung 3.7: Metabolismus der Triazolobenzodiazepine (1)

Als letztes seien noch die Triazolobenzodiazepine erwähnt, welche durch 1,4-Hydroxylierung eliminiert werden und sich durch Ringspaltung auch Benzophenone bilden können (siehe Abbildung 3.7).

Da einige Vertreter der Benzodiazepine eine hohe Lipophilität aufweisen, können diese auch noch einige Wochen nach Verabreichung des Medikamentes im Urin detektiert werden.

3.1.3 Erfassung der Metabolite: Assays im Vergleich

Die Antikörper der hier verwendeten Enzymimmunoassays richten sich gegen die Grundstrukturen der Benzodiazepine. Dies entspricht einem sogenannten „Gruppentest“, der nicht spezifisch ein Präparat nachzuweisen vermag, sondern gemeinsame Strukturen verschiedener Wirkstoffe, um ein breiteres Spektrum abdecken zu können.

In der Tabelle 3.1 (siehe unten) wurde versucht, die verschiedenen Assays anhand diverser Derivate und Metabolite der Benzodiazepine zu vergleichen. Wie bereits in Kapitel 2.3.2 (Kreuzreaktivität und ihre Folgen) beschrieben, lässt sich für jedes Substrat – egal ob strukturverwandt mit dem nachzuweisenden Metaboliten oder nicht, eine Kreuzreaktivität mit dem Antikörper bestimmen. Diese gibt eine Aussage, in welchem Ausmaß dieses Substrat ebenso wie der eigentlich gesuchte Metabolit eine positive Reaktion ergibt. Wie in der Tabelle ersichtlich, wurden hier die Konzentrationen aufgeführt, bei denen die genannten Stoffe mit den jeweiligen Assays *CEDIA*, *DRI* und *Emit II* eine positive Reaktion bewirken.

Bei diesem Vergleich fällt für die Substanzgruppe der Benzodiazepine auf, dass der *DRI* im Vergleich zum *CEDIA* ebenso schlecht glucuronidierte Metabolite nachweist (bei Lorazepam, Oxazepam, Temazepam), bei einem Cut-off-Wert von 200ng/ml für *DRI* und 300 ng/ml bei *CEDIA*, aufgrund der Diskrepanz von glucuronidierten zu nicht glucuronidierten Metaboliten. Beim *CEDIA* Verfahren wurde nicht der „high sensitivity“ Test verwendet (also ohne β -Glucuronidase), so dass bei Beurteilung der anderen Assays ein Cut-off von 300 ng/ml zum Vergleich zugrunde gelegt werden muss (*Emit II* und *DRI* hingegen 200 ng/ml).

Metabolite/EIA	CEDIA (ng/ml)	DRI (ng/ml)	Emit II (ng/ml)
Nitrazepam	300	-	200
Alprazolam	138	300	100
Alprazolam- Glucuronid	-	1000	-
Bromazepam	300	500	340
Chlordiazepoxid	2083	3000	800
Clobazam	400	1000	180
Clonazepam	188	300	250
Clorazepat	325	300	-
Delorazepam	150	300	-
Demoxepam	1900	-	500
Desalkylflurazepam	138	-	230
Diazepam	110	200	110
Estazolam	125	-	120
Flunitrazepam	188	300	220
Flurazepam	150	300	110
Halazepam	200	-	140
Lorazepam	208	400	750
Lorazepam- Glucuronid	10000	1000 (n)⁶	-
Lormetazepam	163	300	230
Medazepam	200	300	130
Nordiazepam	150	300	150
Oxazepam	275	200	200
Oxazepam- Glucuronid	10000	10000 (n)⁶	-
Oxaprozin	10000	-	24000
Prazepam	150	300	110
Temazepam	175	300	190
Temazepam- Glucuronid	10000	10000 (n)⁶	-
Triazolam	138	300	120

Tab. 3.1: Darstellung der Konzentrationen einzelner Benzodiazepin-
Verbindungen, zur Ermittlung einer Kreuzreaktion bei
einem Cut-off-Wert von 200 ng/ml für alle 3 Assays
(nach Herstellerangaben (12, 13, 14))

Des Weiteren zeigt der *DRI* gegenüber *Emit II* und *CEDIA* auch ein höheres Konzentrationsniveau für alle Substanzen außer für Oxazepam. Dies bedeutet, dass er die gleichen

⁶ Bei den mit (n) gekennzeichneten Konzentrationen ergab sich für die betreffende Substanz ein negatives Ergebnis bei dem jeweiligen Assay. Alle anderen Konzentrationen wurden als positiv bewertet.

Substanzen, bzw. Metaboliten erst ab einer höheren Konzentration im Urin erkennen würde, somit die Kreuzreaktivität für diese Substanzen geringer wäre als bei den anderen beiden Immunoassays.

Somit weist der *DRI* Assay schon in einem ersten Vergleich Unterschiede zu den anderen beiden EIA auf, die sich ggf. im weiteren Verlauf der Studie bemerkbar machen können.

Für *Emit II* wurden seitens des Herstellers keine Angaben zu Kreuzreaktivitäten in Bezug auf glucuronidierte Metabolite gemacht, so dass hier mögliche statistische Unterschiede nicht mit diesen Erklärungen gerechtfertigt werden können.

3.2 Amphetamine: Drogen aus laborchemischer Produktion

3.2.1 Chemischer Aufbau und strukturelle Eigenschaften

Eine weitere Substanzklasse, die ebenfalls in die Kategorie „Gruppentests“ hinsichtlich des Screenings mittels Immunoassays fällt, stellen die synthetisch hergestellten Amphetamine dar. Sie gehören der Gruppe von Weckaminen und Psychostimulantien – ebenso wie das Cocain – an und waren bereits im ersten Teil des letzten Jahrhunderts bekannt. Die so genannten „Straßennamen“, unter denen Amphetamine bekannt sind, umfassen folgende Wirkstoffe (siehe Tabelle 3.2)

Wirkstoffe	Straßennamen
Amphetamine	Bennies, Speed
Methamphetamine	Speed, crystal, crank, go, ice, meth, oxblood
2-CB	Bromo, Nexus, Spectrum, Erox, XTC
DOM	Serenity, tranquillity, peace pill
MDA	Love pill, speed
MDMA	Adam, ecstasy, E, M&M, MDM, XTC
PMA	Ecstasy
MDE	Eve

**Tab. 3.2: Straßennamen verschiedener Amphetaminderivate
(aus Drummer (5))**

Amphetamine weisen Ähnlichkeiten zu legal verwendeten Stimulantien auf, welche hier nur erwähnt werden sollen. Wie folgende Abbildung zeigt, versteht man unter reinem Amphetamin die chemische Struktur Phenylisopropylamin – bestehend aus einer Ringstruktur kombiniert mit einer Isopropylstruktur und einer Amin-Endung. Verschiedene Wirkstoffe entstehen durch Substitution sowohl am Aminende wie auch am Ringsystem (siehe Abbildung 3.8).

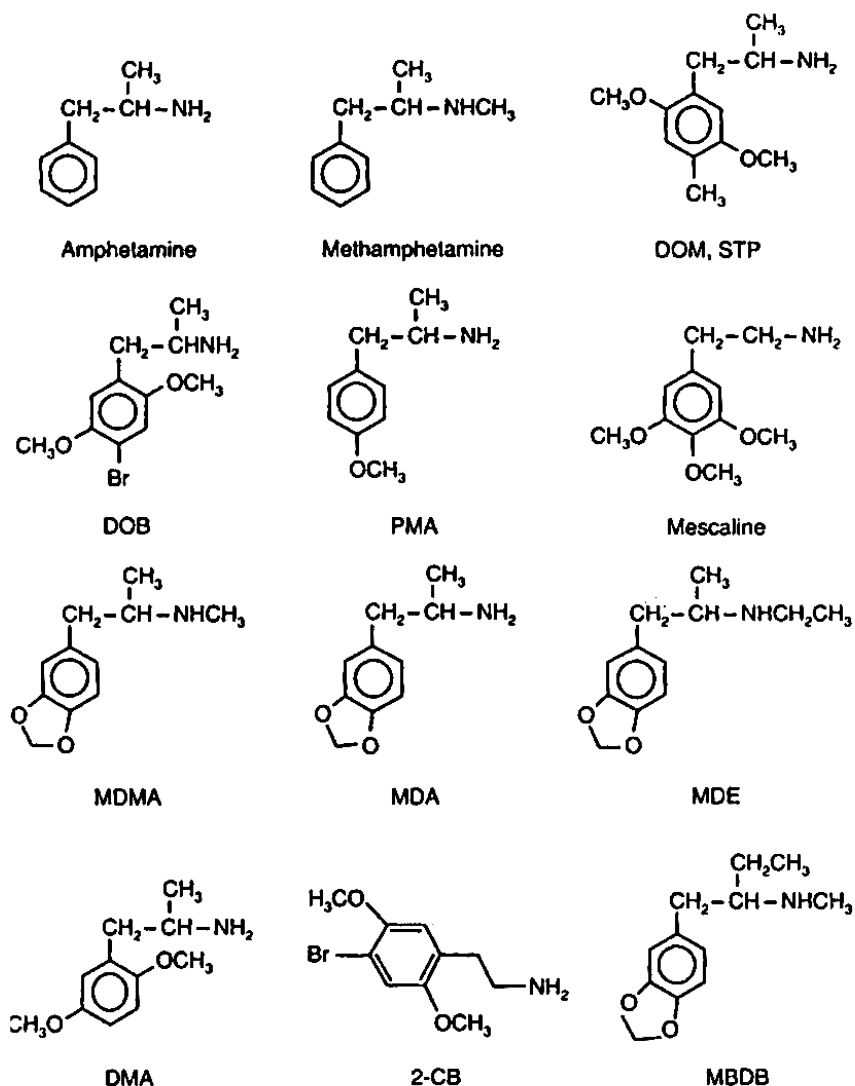


Abbildung 3.8: Darstellung von Amphetamin und verschiedenen Derivaten (aus Drummer (5))⁷

⁷ Die Abkürzungen der Amphetaminderivate in der Abbildung 3.4 stehen für folgende Stoffe: DOM: 4-methyl-2,5-dimethoxyamphetamine; DOB: 4-bromo-2,5-dimethoxyamphetamine; PMA: 4-methoxyamphetamine; MDMA: Methylenedioxyamphetamine; MDA: Methylenedioxyamphetamine; MDE: Methylenedioxyethylamphetamine; DMA: 2,5-dimethoxyamphetamine; 2-CB: 2,5-dimethoxy-4-bromophenethylamine; MBDB: N-Methyl-bromodioxazolylbutanamine

3.2.2 Metabolismus: Pharmakodynamik und Pharmakokinetik

Die Metabolisierung der Amphetamine erfolgt durch Hydroxylierung sowohl an der Ringsstruktur wie auch an den Kohlestoffatomen der Seitenketten. Des weiteren werden Veränderungen am Stickstoffatom vorgenommen und evtl. Alkylgruppen an dessen Ende entfernt. Metabolite mit Hydroxylgruppen werden mit Glucuronsäure oder im Falle von Benzoesäuren mit Glycin oder Sulphatester konjugiert. (siehe Abbildung 3.9). Dabei sei anzumerken, dass die Exkretionsraten der Amphetamine pH-abhängig sind. Beim Amphetamin z.B. werden bei saurem pH 78% der Stoffe innerhalb von 24 Stunden ausgeschieden, davon 68% unverändert. Ein eher alkalischer Urin senkt die Ausscheidung im Urin um mehr als 30 % auf etwa 45% pro 24 Stunden, davon werden lediglich 2% der Substanz in unveränderter Form eliminiert.

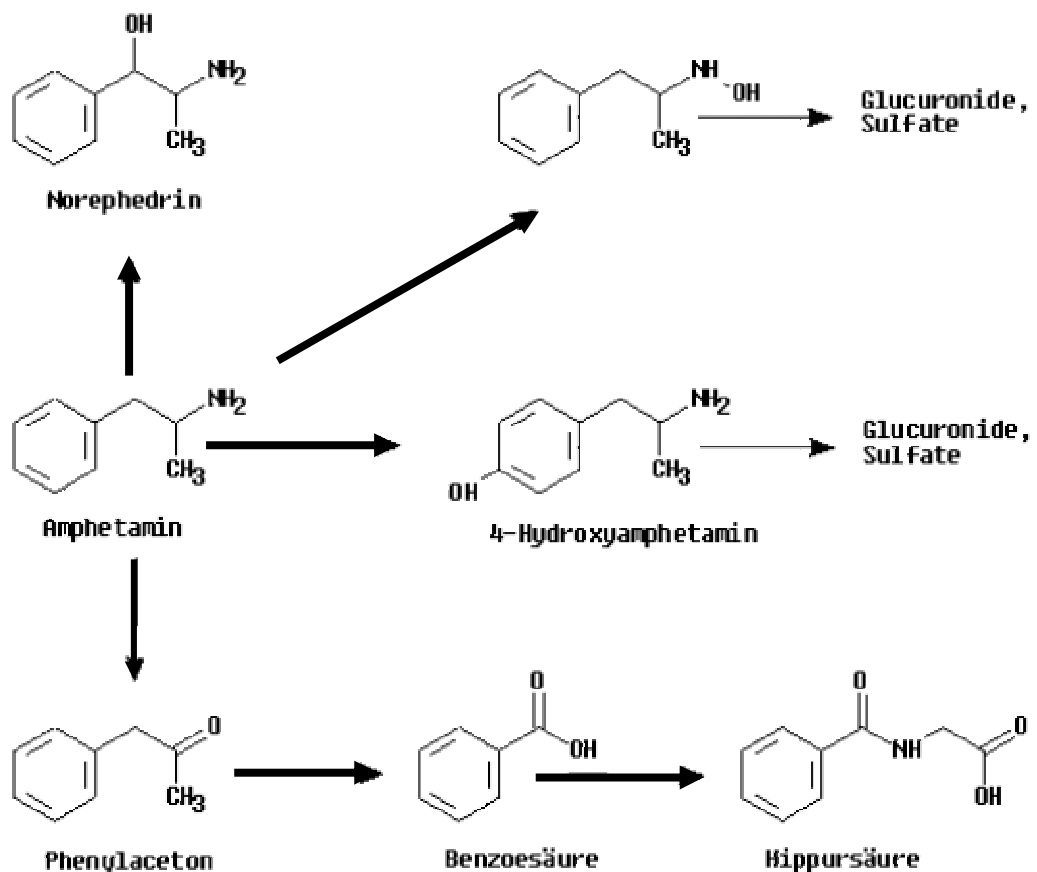


Abbildung 3.9: Metabolisierung des Amphetamins (1)

Das Methamphetamin hingegen wird nur zu 62% in 24 Stunden ausgeschieden, davon 44% unverändert, der Rest jeweils zu Amphetamin (6-20%) oder zu 4-Hydroxymethamphetamin (ungefähr 10%) metabolisiert (siehe Abbildung 3.10).

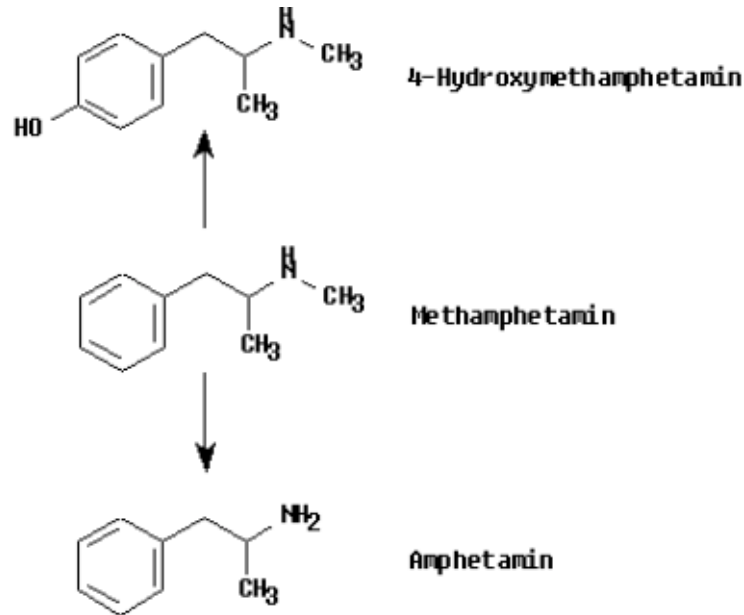


Abbildung 3.10: Metabolismus des Methamphetamins (1)

Das MDMA (Ecstasy) kann metabolisiert werden durch N-Methylierung, Ringöffnung, Methylierung und Glucuronidierung, wird jedoch vorwiegend unverändert eliminiert (siehe Abbildung 3.11).

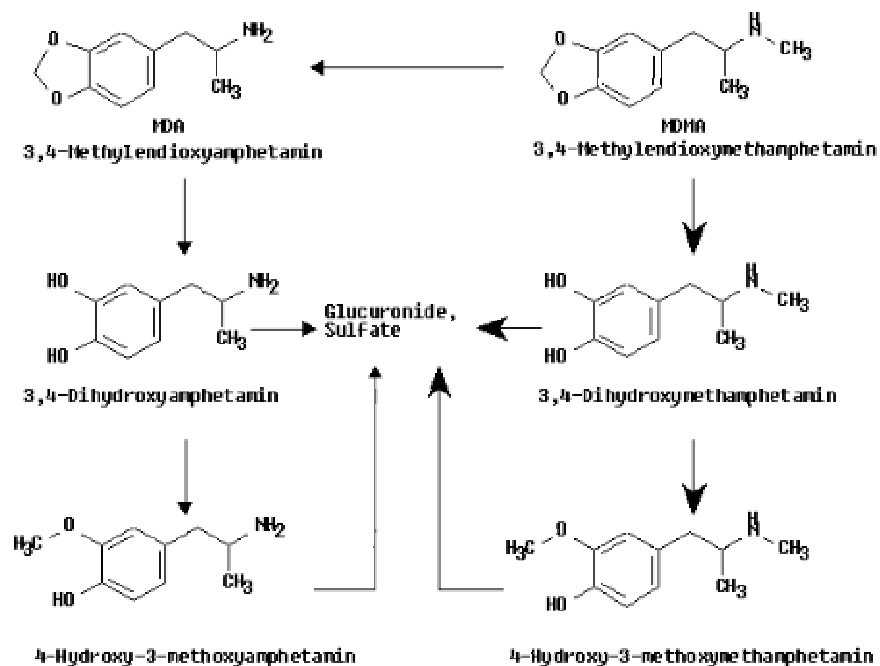
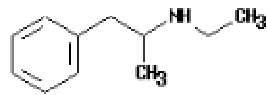


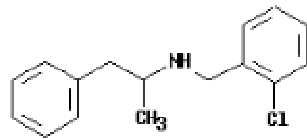
Abbildung 3.11: Metabolismus des MDMA (1)

Ein Teil der Amphetaminderivate (ebenso auch gewisse Medikamente) kann nach Konsum – unverändert oder umgewandelt zu Amphetamin oder Methamphetamin – ebenfalls über die Nieren ausgeschieden werden (siehe Abbildung 3.12).

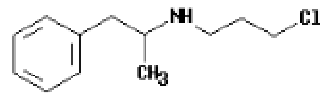
Amphetamin als Metabolit



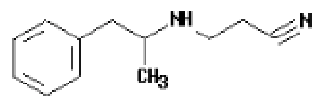
Ethylamphetamine



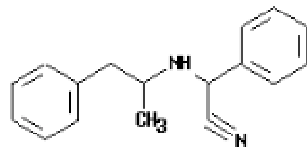
Clobenzorex



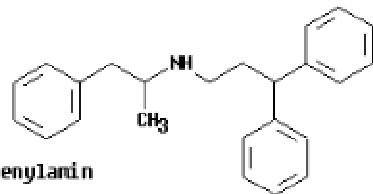
Mefenorex



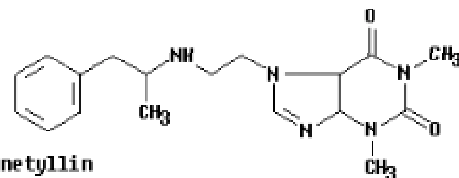
Fenproporex



Anfetaminil

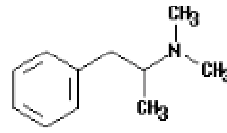


Prenylamin

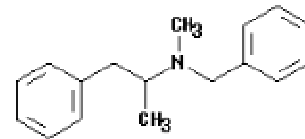


Fenetyllin

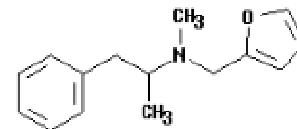
Methamphetamin als Metabolit



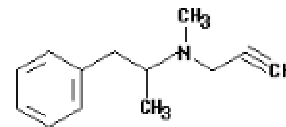
Dimethylamphetamine



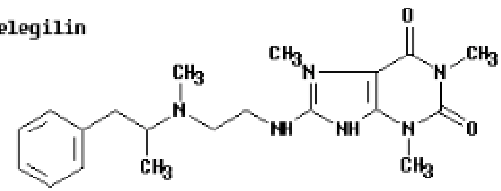
Benzphetamine



Furfenorex



Selegilin



Fencamin

Abbildung 3.12: Abbauege einiger Substanzen mit Amphetamin oder Methamphetamin als Metabolit (1)

3.2.3 Erfassung der Metabolite: Assays im Vergleich

Die verwendeten Enzymimmunoassays versuchen im Urin durch Antikörper gegen d-Amphetamin und Methamphetamin Amphetamine nachzuweisen.

Es handelt sich bei den Amphetaminen für alle drei Assays ebenfalls um sogenannte Gruppentests, da sie auch lediglich Grundstrukturen versuchen nachzuweisen. Genauso wie für die Benzodiazepine werden in unten anschließender Tabelle die Konzentrationen verglichen, bei denen gewisse Substanzen – meistens Metabolite der Amphetamine – und deren aufgeführte Konzentrationen ein positives Ergebnis erbrachten, somit kreuzreagierten (siehe Tabelle 3.3).

Dabei fällt auf, dass für die Substanzen, die als Kalibratoren für die drei Assays dienen – nämlich d-Amphetamin und d-Methamphetamin – eine ausgezeichnete Übereinstimmung für drei EIA besteht für einen Cut-off-Wert von 1000 ng/ml. Betrachtet man nur das l-Amphetamin – also die linksdrehende Form des Amphetamins –, so weist allein der *Emit II* Assay eine gewisse Kreuzreaktivität auf, die beiden anderen reagieren kaum. Da letztere Substanz, ebenso wie Methamphetamin, auch Abbauprodukte von Selegilin (Antiparkinson-Wirkstoff), Fenetylin (Stimulans) sowie Benzphetamin (Appetit-zügler) sein können (siehe Abbildung 3.10 und 3.12), ist die Präsenz von Amphetamin oder Methamphetamin nicht beweisend für einen Drogenkonsum; sie muss mittels weiterer Verfahren wie der GC-MS bestätigt werden. Da l-Amphetamin als Metabolit des Selegilin speziell im Urin erscheint, ist der *Emit II* im Vergleich zu *CEDIA* und *DRI* (siehe Tabelle 3.3) anfälliger gegenüber diesem Antiparkinson-Präparates.

Beim MDA weisen sowohl *DRI* als auch *Emit II* eine gewisse Kreuzreaktivität (2500 und 3000 ng/ml) auf im Gegensatz zu *CEDIA* (50000 ng/ml), so dass Drogen, die MDA als Abbauprodukt haben (siehe Tab. 3.2) besser von *DRI* und *Emit II* erkannt werden, andererseits auch ein Ergebnis eher verfälschen können.

Umgekehrt verhält es sich beim MDMA, wo *CEDIA* mit 1500 ng/ml bei einer wesentlich geringeren Konzentration als *Emit II* und *DRI* (5000 und 6000 ng/ml) reagiert.

Für die Substanzen Phentermin, Benzphetamin und Phenmetrazin gibt allein der Hersteller von *Emit II* geringe Konzentrationen, somit eine erhöhte Kreuzreaktivität an, bei *DRI* ergaben diese Metabolite keine positiven Ergebnisse, für *CEDIA* lagen in zwei von drei Fällen keine Daten vor.

Da Amphetamine zu einem beträchtlichen Prozentsatz unverändert ausgeschieden werden (wie oben beschrieben), steht der Nachweis des Amphetamins im Vordergrund.

Metabolite/EIA	CEDIA (ng/ml)	DRI (ng/ml)	Emit II (ng/ml)
d-Amphetamin	1000	1000	1000
l-Amphetamin	40000	12500 (n)⁸	6000
d,l-Amphetamin	1500	-	1500
l-Ephedrin	250000	350000 (n)⁸	180000
d-Methamphetamin	1000	1000	1000
d,l-Methamphetamin	1000	-	1200
l-Methamphetamin	8000	10000 (n)⁸	2000
3,4-Methylendioxy- amphetamin (MDA)	50000	2500	3000
3,4-Methylendioxy- methamphetamin (MDMA)	1500	5000	6000
Phentermin	50000	25000 (n)⁸	2000
Phenylpropanolamin	500000	250000 (n)⁸	290000
d-Pseudoephedrin	160000	250000 (n)⁸	670000
Fenfluramin	-	4000 (n)⁸	36000
Benzphetamin	-	20000 (n)⁸	1500
Mephentermin	-	25000 (n)⁸	10000
Phenmetrazin	-	50000 (n)⁸	6000
Propranolol	-	200000 (n)⁸	160000

**Tab. 3.3: Darstellung der Konzentrationen einzelner Amphetamin-
Verbindungen, zur Ermittlung einer Kreuzreaktion bei
bei einem Cut-off-Wert von 1000 ng/ml
(nach Herstellerangaben (12, 13, 14))**

⁸ Bei den mit (n) gekennzeichneten Konzentrationen ergab sich für die betreffende Substanz ein negatives Ergebnis bei dem jeweiligen Assay. Alle anderen Konzentrationen wurden als positiv bewertet.

3.3 Opiate: vom chinesischen Handel zur Substitutionstherapie

3.3.1 Chemischer Aufbau und strukturelle Eigenschaften

In diesem Abschnitt sollen sowohl die Substanzklasse der Opiate wie auch einer ihrer Abkömmlinge, das Methadon, besprochen werden, das eine ähnliche pharmakologische Wirkung wie das Morphin aufweist und bei Patienten zum Suchtmittelentzug verwendet wird.

Opium wurde früher zum Herbeiführen von Euphorie, Analgesie und Obstipation (bei Diarrhöen) verwendet. Der deutsche Apotheker Sertürner isolierte als erster zu Beginn des vorletzten Jahrhunderts den Wirkstoff Morphin aus Rohopium, der eingetrocknete Saft des Schlafmohns (*papaver somniferum*). Dieser Prozess ermöglichte die intravenöse Applikation bis hin zur Entwicklung weiterer synthetischer Derivate.

Die Wirkung des Morphins und seiner Derivate besteht aufgrund der Bindung der Substanzen an Opioid-Rezeptoren, von denen es drei verschiedene gibt, die im Körper auf mannigfache Weise verteilt sind. Die unterschiedliche Verteilung und die gleichzeitig differierende Affinität der jeweiligen Substanzen sorgen für die euphorisierende, analgetische, pupillenverengende, obstipierende, atemdepressive oder zentral dämpfende Wirkung der Stoffgruppe.

Der chemische Aufbau der Opiate orientiert sich an der Grundstruktur des Morphins. Wie aus unten aufgeführtem Schema ersichtlich (siehe Abbildung 3.13), besteht das Molekül aus drei zusammengeschlossenen Ringsystemen (Ring A, B, C), zwei Hydroxylgruppen in Positionen 3 und 6 und einer N-Methylgruppe sowie einem vierten Ring, der an den B-Ring angehängt wurde mit jenem Stickstoffatom.

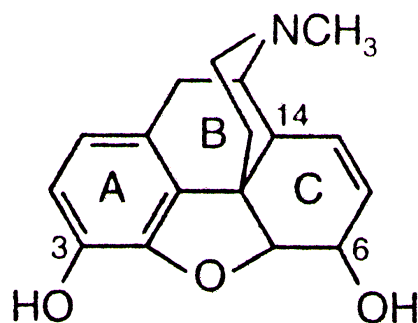
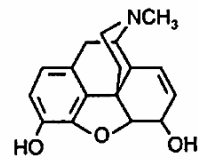


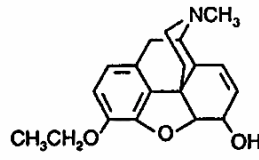
Abbildung 3.13: Darstellung der Morphin Grundstruktur (aus Drummer (5))

Betrachtet man die im folgenden angeführten Abkömmlinge des Morphins - egal ob natürlich oder synthetisch hergestellt - (siehe Abbildung 3.14), so kann man feststellen, dass diese durch Veränderungen an den Hydroxylgruppen bzw. an den Ringsystemen entstanden sind.

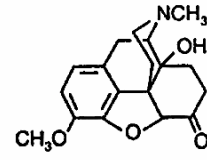
Natural and semi-synthetic phenanthrenes (a)



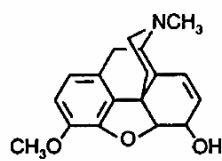
Morphine (strong)



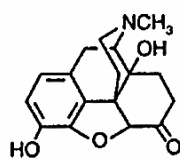
Ethylmorphine (weak)



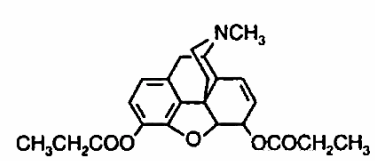
Oxycodone (moderate)



Codeine (weak)

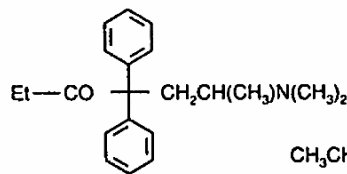


Oxymorphone (strong)

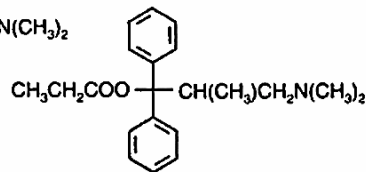


Heroin (strong)

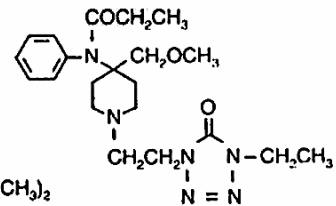
Synthetic phenylheptylamines (b) and phenylpiperidines (c)



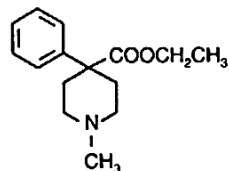
Methadone (strong, b)



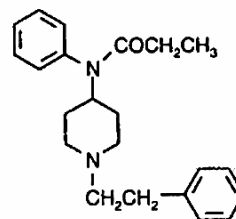
Propoxyphene (weak, b)



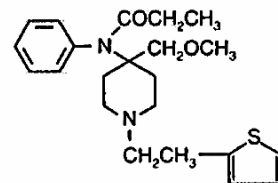
Alfentanil (strong, c)



Pethidine (meperidine) (moderate, c)

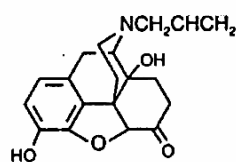


Fentanyl (strong, c)

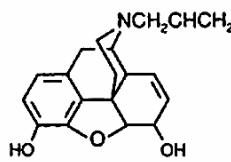


Sulfentanil (strong, c)

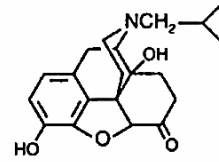
Struktur von Opioid-Agonisten



Naloxone



Nalorphine



Naltrexone

Struktur von Opioid-Antagonisten

Abbildung 3.14: Darstellung einer Auswahl von Opiaten (aus Drummer (5))

Wie oben erwähnt kann man Opiode hinsichtlich ihrer Rezeptoraktivität einteilen, wobei einige von Ihnen (sogenannte reine Agonisten) eher eine Affinität zu μ -Rezeptoren und zum Teil an κ -Rezeptoren zeigen, während andere (reine Antagonisten) an alle Rezeptoren binden, jedoch jeden von ihnen inhibieren. Die letzte Gruppe - die partiellen Agonisten / Antagonisten - inhibiert oder aktiviert die Rezeptoren auf unterschiedliche Weise (siehe Tabelle 3.3).

Wirkstoff	μ -Rezeptor	κ -Rezeptor	δ -Rezeptor
Morphin	+++	+	+
Naloxon	-	-	-
Pentazocin	+/0	+	?
Butorphanol	+/0	+	?
Nalbuphin	-	+	?
Buprenorphin	+	-	?
Fentanyl	+++	+	+
Dezocin	+	+	+

Tab. 3.4: Darstellung der Wirkung einiger Opioidanalgetika auf Opioid-Rezeptoren⁹ (aus Julien (18))

3.3.2 Metabolismus: Pharmakodynamik und Pharmakokinetik

Die Metabolisierung erfolgt auf unterschiedlichste Art und Weise je nach Struktur des jeweiligen Wirkstoffes (siehe Abbildung 3.15).

Morphin wird durch Glucuronidierung in der 3. und 6. Position metabolisiert. Die Ausscheidung von Morphin erfolgt als Glucuronid durch renale Exkretion, wobei allein 85% des Wirkstoffes innerhalb von 24 Stunden ausgeschieden werden. Nur ein kleiner Anteil - ungefähr 2- 10% - wird unverändert ausgeschieden. Das in der Leber gebildete Morphin-3-Glucuronid stellt den Hauptanteil an metabolisiertem Morphin bei oraler Aufnahme dar (Morphin 6-Glucuronid findet sich lediglich in 5fach niedrigerer Konzentration im Vergleich zum Morphin-3-Glucuronid (5)), weshalb dieser Metabolit auch

⁹ Der μ -Rezeptor vermittelt wahrscheinlich die supraspinale Analgesie, Atemdepression, Euphorie und körperliche Abhängigkeit. Der κ -Rezeptor vermittelt seinerseits Spinalanalgesie, Pupillenverengung und Sedierung. Der δ -Rezeptor vermittelt ebenso Euphorie, Analgesie, Atemdepression und Abhängigkeit, findet sich jedoch an anderen Stellen im Körper als der μ -Rezeptor. Die Angaben beruhen auf Wirkungen beim Menschen, soweit bisher ermittelbar. Die agonistische Wirkung in Tabelle 3.3 wird mit „+“ angegeben, antagonistische mit „-“; „0“ bedeutet keine signifikante Wirkung und mit „?“ sollen das Fehlen von Daten gekennzeichnet werden

von vielen Immunoassays im Urin erfasst wird. Glukuronidierte Metabolite des Morphins können ebenfalls über biliäre Wege ausgeschieden werden, wobei hier ein Teil erneut rückresorbiert wird.

Diacetylmorphin (Heroin) wird durch Esterasen zu 6-Monoacetylmorphin (6-MAM) und weiter zu Morphin metabolisiert und folglich als 3-O und 6-O-Glucuronid ausgeschieden. Da neben diesen Glucuroniden ebenso das 6-MAM im Urin vorkommt, kann dieses als spezifischer Marker des Heroins ebenfalls im Urin mittels spezieller Assays nachgewiesen werden. Die Eliminationshalbwertszeit des Heroins beträgt in etwa 3-20 min, 6-MAM 9-40 min, Morphin 1-7h.

Codein als ein weiteres Morphinderivat wird ebenso zu Morphin demethyliert, und dann als Glucuronid ausgeschieden.

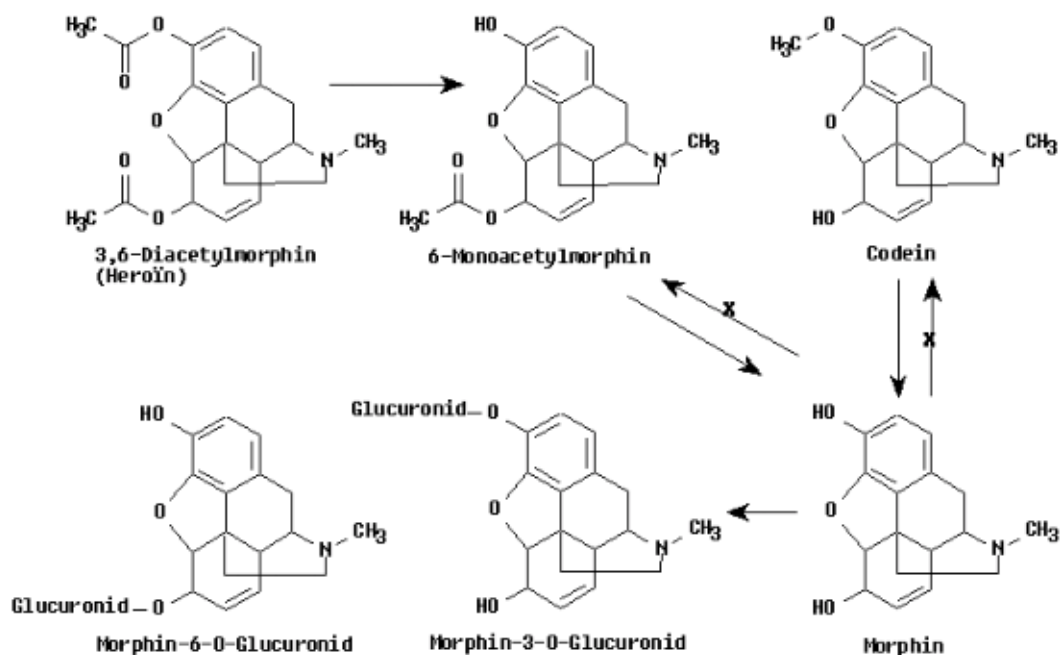


Abbildung 3.15: Darstellung der Metabolisierung von Heroin, Morphin und Codein (1)

Methadon kann unverändert – je nach Dauer der Einnahme und pH-Wert – oder durch die Desalkylierung als EDDP (2-Ethyliden-1,5-Dimethyl-3,3-Diphenylpyrrolidin) oder EMDP (2-Ethyl-5-Methyl-3,3-Diphenylpyrrolidin) als zyklische Verbindung im Urin ausgeschieden werden.

Die generellen Schritte der Metabolisierung verschiedener Opiate soll nochmals anhand folgender Abbildung dargestellt und verglichen werden (siehe Abbildung 3.16).

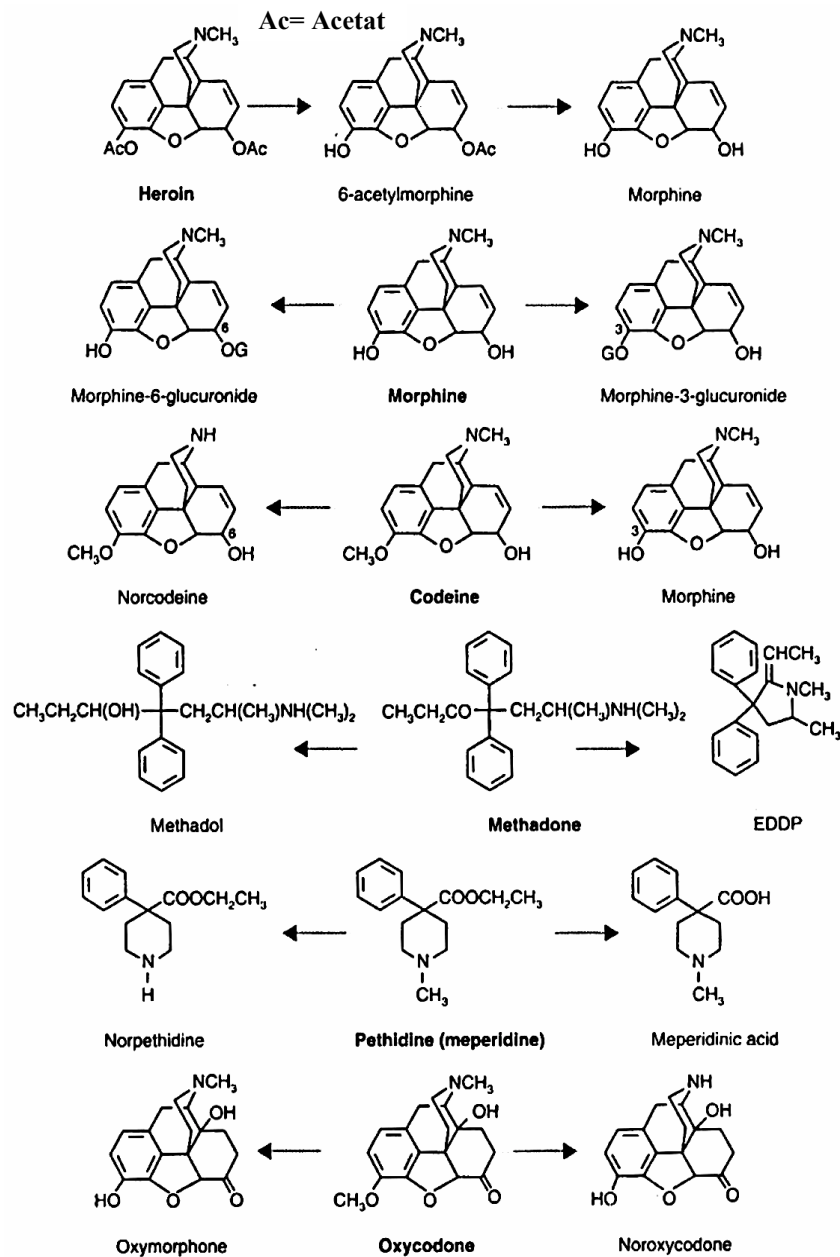


Abbildung 3.16: Darstellung der möglichen Abbauewege einer Auswahl von Opiaten (aus Drummer (5))

3.3.3 Erfassung der Metabolite: Assays im Vergleich

Bei den Opiaten wurden bei allen drei im Studienprotokoll verwendeten Enzymimmunoassays Antikörper gegen Morphin bzw. dessen Grundstruktur verwendet (laut Angaben der Hersteller). Dabei wurde abermals versucht, die drei Assays anhand ihrer Kreuzreaktivitäten verglichen. Die Konzentrationen, bei denen *CEDIA*, *DRI* und *Emit II* ein positives Ergebnis, dem Cut-off-Wert von 300 ng/ml entsprechend lieferten, sind in folgender Tabelle gegenübergestellt.

Metabolite/EIA	CEDIA (ng/ml)	DRI (ng/ml)	Emit II (ng/ml)
Morphin	300	300	300
Codein	300	180	240
Heroin (Diacetyl- morphin)	300	350	-
Dihydrocodein	300	450	270
Hydrocodon	300	1700	400
Hydromorphon	300	4000	500
Imipramin	20000	100000 (n)¹⁰	-
Morphin-3- glucuroind	300	600	800
Morphin-6- glucuronid	300	300	-
6-Monoacetyl- morphin (6-MAM)	300	380	500
Pethidin	150000	20000 (n)¹⁰	90000
Oxymorphon	20000	40000	32000
Oxycodon	10000	16000	4000

Tab. 3.5: Darstellung der Konzentrationen einzelner Opiatverbindungen, zur Ermittlung einer Kreuzreaktion bei einem Cut-off-Wert von 300 ng/ml für alle 3 Assays (nach Herstellerangaben (12, 13, 14))

Bei der Erkennung des Morphins in nicht glucuronidierter Form zeigen alle drei Assays Übereinstimmung, was zeigt, dass alle drei Morphin als Kalibratorsubstanz verwenden. Da diese Substanz, wie bereits oben erwähnt, zum größten Teil als Glucuronid ausgeschieden wird, gilt es vor allem diese Ergebnisse zu bewerten. Dabei erweist sich das *CEDIA* System gegenüber *DRI* und *Emit II* in seiner Kreuzreaktivität für Morphin-3-glucuronid überlegen, da die Konzentration des positiven Ergebnisses dem zugrunde gelegten Cut-off-Wert entspricht. Der *DRI* nähert sich diesem Wert noch mehr als der *Emit II* Assay, so dass darauf geschlossen werden kann, dass *Emit II* Glucuronide schlechter erkennen würde als *DRI*. Bei Morphin-6-glucuronid zeigen *CEDIA* wie auch *DRI* eine 100% Kreuzreaktivität auf, so dass dieser Metabolit von *DRI* ebenso wie von *CEDIA* mit erfasst wird. Für *Emit II* liegen seitens des Herstellers wiederum keine Daten vor. Für 6-MAM als spezifisches Abbauprodukt des Heroins gleichen sich *DRI* und *CEDIA*, so dass der Opiat-Test für diese beiden Assays ebenso den unmittelbaren Meta-

¹⁰ Bei den mit (n) gekennzeichneten Konzentrationen ergab sich für die betreffende Substanz ein negatives Ergebnis bei dem jeweiligen Assay. Alle anderen Konzentrationen wurden als positiv bewertet.

boliten des Diacetylmorphins erkennen würde, *Emit II* ist hier den beiden Systemen minimal unterlegen.

Für Codein wurden für *DRI* wie auch *Emit II* Konzentrationen unterhalb des Cut-off-Wertes ermittelt, so dass diese Substanz sogar empfindlicher als Morphin erfasst wird und somit die Möglichkeit besitzt, eine Urinprobe zu verfälschen. Für Dihydrocodein gilt dies nur für den *Emit II*, das *DRI* System weist aufgrund der zweiten Hydroxyverbindung mit diesen Metaboliten eine geringere Kreuzreaktivität auf.

Für weitere Opiate wie Hydrocodon und Hydromorphon ähneln sich *CEDIA* und *Emit II*, *DRI* erkennt diese Substanzen schlechter, ist somit spezifischer für Morphin und dessen unmittelbare Metaboliten. Allein für Oxycodon weist *Emit II* als einziger Assay eine höhere Kreuzreaktivität auf als die anderen.

Damit kann man zusammenfassen, dass alle drei Assays die Kalibratorsubstanz gut erkennen, *DRI* diesmal besser Glucuronide mit erfasst und spezifische Metaboliten wie das 6-MAM ebenso kreuzreagieren, so dass auch ein unmittelbarer Heroinkonsum detektiert werden kann, ungeachtet der Tatsache, dass bei Heroinkonsum Morphin stets in höherer Konzentration vorliegt als 6-MAM (4), das Austesten dieser Substanz somit als Bestätigung eines fraglichen Konsums von Heroin gesehen werden kann.

3.3.4 Methadon als Substitutionstherapie

Für Methadon ergaben sich folgende Ergebnisse (siehe Tabelle 3.6):

Metabolite/EIA	CEDIA (ng/ml)	DRI (ng/ml)	Emit II (ng/ml)
Methadon	300	300	300
Alpha-Methadol	33333	-	-
EDDP	500000	10000 (n)¹¹	-
EMDP	100000	10000 (n)¹¹	-
l-Acetylmethadol (LAAM)	20000	5000 (n)¹¹	25000 (n)¹¹
Methadol	25000	750	-
Propoxyphen	500000	250000 (n)¹¹	300000 (n)¹¹

Tab. 3.6: Darstellung der Konzentrationen einzelner Methadon-Verbindungen, zur Ermittlung einer Kreuzreaktion bei einem Cut-off-Wert von 300 ng/ml für alle 3 Assays (nach Herstellerangaben (12, 13, 14))

¹¹ Bei den mit (n) gekennzeichneten Konzentrationen ergab sich für die betreffende Substanz ein negatives Ergebnis bei dem jeweiligen Assay. Alle anderen Konzentrationen wurden als positiv bewertet.

Die verwendeten Assays richten beim Methadon hauptsächlich gegen die Grundstrukturen des Wirkstoffs an sich. Die Möglichkeit des Nachweises von EDDP besteht, da EDDP in etwa gleicher Konzentration wie Methadon im Urin vorliegt. In einer Studie zu *CEDIA* wird berichtet, dass der positive Nachweis von methadonverdächtigen Proben – bei dem Vergleich eines *CEDIA* Methadon Assays mit einem EDDP Assay von *CEDIA* – besser mit dem EDDP Assay erreicht wurde, somit ein EDDP Nachweis geeigneter für das Screening von Methadon erscheint (9). Deshalb könnte man mit dem Nachweis von EDDP ggf. gezielter Methadonkonsum nachweisen, jedoch wurde dieser Parameter in der Studie zu dieser Dissertation nicht mit einbezogen.

Wie die Ergebnisse zeigen, sind alle drei Assays sehr spezifisch für Methadon aufgrund der 100% Kreuzreaktivität bei einem Cut-off-Wert von 300 ng/ml, alle anderen Substanzen reagieren nur in einem äußerst geringen Maße wenn überhaupt mit den in den Assays vorhandenen Antikörper. Einen der Hauptmetaboliten des Methadons, dem EDDP, erkennt der *DRI* nicht, einzig im Bezug auf das Methadol weist er eine höhere Kreuzreaktivität auf. Des weiteren gilt zu klären, ob bei Methadon verdächtigen Proben die chemisch unterschiedlichen Formen des Methadon, L-Methadon und D,L-Methadon Unterschiede im Nachweis darstellen. Da nicht nur in Deutschland zur Opiat Substitution das Racemat des Methadon, das D,L-Methadon, verwendet wird (da Methadon ein chirales Zentrum besitzt), wird bei den Assays D,L-Methadon als Metabolit häufig nachgewiesen und somit weisen auch die hier untersuchten Assays diesen Stoff (in Tabelle 3.6 als Methadon gekennzeichnet) mit absoluter Übereinstimmung nach, wie bereits erwähnt. Bezüglich des L-Methadon (der linksdrehenden Form des Methadon) wird in der hier verwendeten Literatur (5) und den Angaben der Hersteller (12, 13, 14) keine Angaben zu Unterschieden und Kreuzreaktivitäten im Nachweis gemacht.

Insgesamt lässt sich jedoch zusammenfassen, dass aufgrund dieses Kreuzreaktivitätsvergleiches der Methadon Screening Test für alle drei Assay sehr spezifisch für Methadon zu sein scheint.

3.4 Cocain, stimulierende Droge oder Lokalanästhetikum

In dem folgenden Abschnitt wurde zur Darstellung des Cocains neben oben aufgeführter Literatur ebenfalls folgendes Werk miteinbezogen: Abused Drugs Monograph Series „Cocaine“ von Yale H. Caplan (4).

3.4.1 Chemischer Aufbau und strukturelle Eigenschaften

Cocain wird aus den Blättern des Coca Strauches gewonnen (*Erythroxylum Coca*), welcher in gewissen Ländern Südamerikas angebaut wird. In der Tradition der Völker der Anden nahm diese Pflanze eine bedeutende Rolle ein, da sie neben mystischen, religiösen, sozialen und stimulierenden Aspekten auch medizinische Bedeutung hatte.

Die sich entwickelnde stimulierende Wirkung des Cocains (vgl. Amphetamine) ist darauf zurückzuführen, dass es die Resorption der catecholaminartigen Neurotransmitter (wie Noradrenalin, Dopamin und Serotonin) in die Präsynapse hemmt. Dadurch verbleiben diese Substanzen im synaptischen Spalt und wirken länger stimulierend. Der Cocain Abhängige verspürt nach Einnahme einen zentral stimulierenden Effekt - sogenannter „rush“ - mit Vasokonstriktion, Bluthochdruck, Tachykardie, Tachypnoe, Hyperaktivität und Euphorie. Dieser Effekt ist gefolgt von einer starken Depression - „crash“ genannt -, welche viel bedeutender ist und somit den Abhängigen zur erneuten Einnahme von Cocain verleitet.

Der chemische Aufbau des Cocains unterscheidet sich von der Grundstruktur der Amphetamine. Die Droge (in chemischen Fachkreisen auch als Benzoylmethylecgonin bekannt) besteht aus dem Ester einer Benzoesäure in Verbindung mit einem Aminoalkohol, dem Ecgonin, welcher chemisch (jedoch nicht pharmakologisch) mit dem Atropin Ähnlichkeiten aufweist (siehe Abbildung 3.9). Mit dieser chemischen Struktur besitzt es die oben erwähnten Fähigkeiten, die Wiederaufnahme catecholaminartiger Neurotransmitter zu hemmen – im Gegensatz zu heutigen Lokalanästhetika, welche einen anderen Wirkmechanismus besitzen.

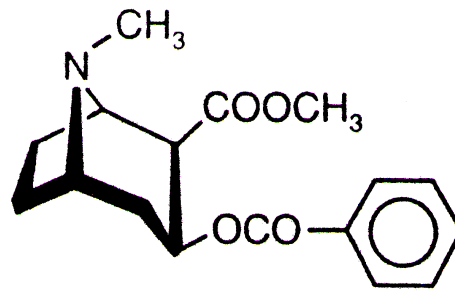


Abbildung 3.17: Abbildung der chemischen Struktur des Cocains (aus Drummer (5))

3.4.2 Metabolismus: Pharmakodynamik und Pharmakokinetik

Die Metabolisierung des Cocains erfolgt hauptsächlich durch die chemische und enzymatische Hydrolyse des Methylesters, und es entsteht der aktive Metabolit Benzoyllecgonin. Dieser stellt den Hauptmetaboliten im Blut wie auch im Urin dar. Neben dem Benzoyllecgonin werden noch andere Metaboliten gebildet, wie es unten aufgeführte Abbildung zeigt; diese machen aber nur einen kleinen Teil des Metabolismus aus. Norcocain, eine der beim Abbau von Cocain gebildeten Substanzen, kann wiederum durch Umwandlung zu N-Hydroxynorcocain zu einem hepatotoxischen Wirkstoff abgebaut werden, dessen Metabolite die gleiche Toxizität entwickeln können.

Cocaethylen, ein weiterer Metabolit des Cocains, wird bei gleichzeitigem Konsum mit Alkohol nachgewiesen.

Im Allgemeinen beträgt die Eliminationshalbwertszeit für das Cocain eine halbe bis 1,5h, für Hauptmetaboliten Benzoyllecgonin 5-8h. Dementsprechend kann man ersteres im Urin ungefähr 6 h, letzteres bis zu 60h nachweisen. Dem sei noch hinzugefügt, dass beim chronischen Konsum sehr hoher Dosen die Metaboliten des Cocains bis zu 60 Tagen im Urin detektierbar sein sollen (4, 5). Des Weiteren ist zu bemerken, dass bei Lagerung des Urins ebenfalls Cocain zu Benzoyllecgonin zerfällt, somit die Konzentrationen an nachzuweisender Substanz ansteigen.

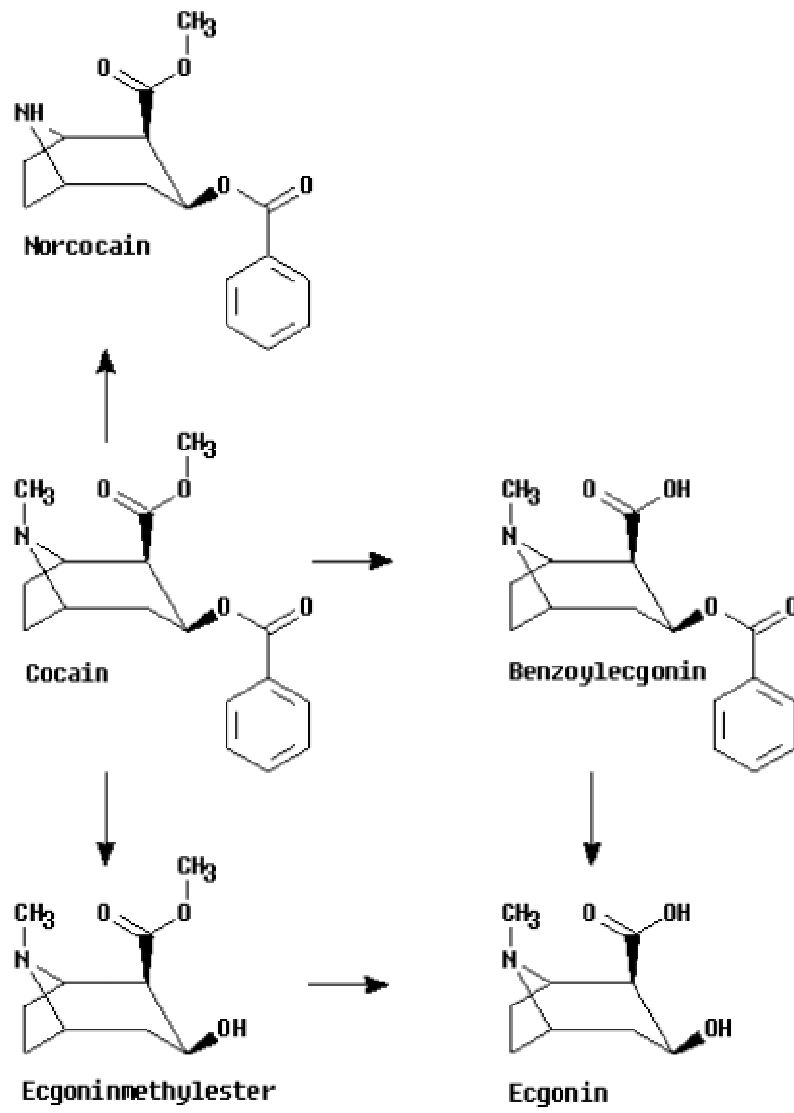


Abbildung 3.18: Darstellung der Abbauege des Cocains (aus Drummer (5))

3.4.3 Erfassung der Metabolite: Assays im Vergleich

Die in dieser Dissertation bereits beschriebenen Enzymimmunoassays weisen alle Benzoyllecgonin als Metabolit im Urin nach. Es handelt sich nach der Literatur um den bereits in vorherigen Kapiteln erwähnten hochspezifischen Monotest, dem eine entsprechend hohe Aussagekraft zugeschrieben wird. Im Gegensatz zu den vorher dargestellten Gruppentests, ergibt sich in diesem Fall folgender Vergleich der Kreuzreaktivitäten (siehe Tabelle 3.7):

Metabolite/EIA	CEDIA (ng/ml)	DRI (ng/ml)	Emit II (ng/ml)
Benzoyllecgonin	300	300	300
Cocaethylen	312	100000 (n)¹²	-
Cocain	312	300	80000
Ecgonin	10000	100000	40000
Ecgoninmethylester	10000	100000 (n)¹²	50000 (n)¹²

Tab. 3.7: Darstellung der Konzentrationen einzelner Cocain-Verbindungen, zur Ermittlung einer Kreuzreaktion bei einem Cut-off-Wert von 300 ng/ml für alle 3 Assays (nach Herstellerangaben (12, 13, 14))

Wie sich hierbei herausstellt, gleichen sich alle drei Assays in ihrer Nachweiskraft, da nur Cocain und sein Hauptabbauprodukt Benzoyllecgonin erfasst werden (außer für Emit II, bei dem der Cocainnachweis eine äußerst niedrige Kreuzreaktivität aufweist). Die Assays reagieren bei Ecgonin und Ecgoninmethylester gleich, so dass diese Konstellation, bisher noch bei keinem der vorhergehenden Substanzklassen festgestellt, charakteristisch für einen Monotest wie dem des Cocains ist.

3.5 Cannabis: Vom Anbau zum Metabolismus

In dem letzten Abschnitt dieses Kapitels wird zur Darstellung der Cannabinoide neben oben aufgeführter Literatur folgendes Werk miteinbezogen: Abused Drugs Monograph Series „Cannabinoids“ von Michael A. Peat (23).

3.5.1 Chemischer Aufbau und strukturelle Eigenschaften

„Die Geschichte des Hanfes als Drogenquelle geht bis auf 2700 Jahre vor unsere Zeitrechnung zurück“ (18).

¹² Bei den mit (n) gekennzeichneten Konzentrationen ergab sich für die betreffende Substanz ein negatives Ergebnis bei dem jeweiligen Assay. Alle anderen Konzentrationen wurden als positiv bewertet.

Die Wahrnehmungsveränderungen, welche bei dem Konsum dieser Droge auftreten, entstehen nur in einem gewissen Gemütszustand und sind gleichzeitig weniger ausgeprägt als bei anderen Substanzen. Auch wurden für die Cannabinoide in der Geschichte diverse medizinischen Anwendungsmöglichkeiten beschrieben. Die Verbreitung des Rauschmittels in Europa fand erst im Laufe des 19. Jahrhunderts statt, obwohl die Römer wie auch die Griechen und der Hexenkult im Mittelalter sich bereits der „Cannabis sativa“ bedienten (18, 23).

Die aktive Komponente der Cannabispflanze stellt hauptsächlich das Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) dar. Weitere Inhaltsstoffe wie Cannabinol oder Cannabidiol sind je nach Anbau der Pflanze in höherer oder niedriger Konzentration vorhanden. Insgesamt existieren über 400 verschiedene aus der Pflanze isolierte Substanzen, wobei mehr als 60 verschiedene Cannabinoide gefunden wurden. Laut Literatur stellt die Gesamtheit dieser Strukturen die Wirkungsweise der Cannabispflanze dar, jedoch wird den Cannabinoiden ein großer Anteil zugeschrieben. Folgende Abbildung (siehe Abbildung 3.19) soll die chemische Beschaffenheit einer Auswahl an Cannabinoiden aufzeigen, bestehend aus Ringstrukturen, Hydroxylgruppen und Kohlenwasserstoffketten. Für die weiteren Erläuterungen und die folgende Studie ist vor allem der Hauptbestandteil, das Δ^9 -THC, von Bedeutung.

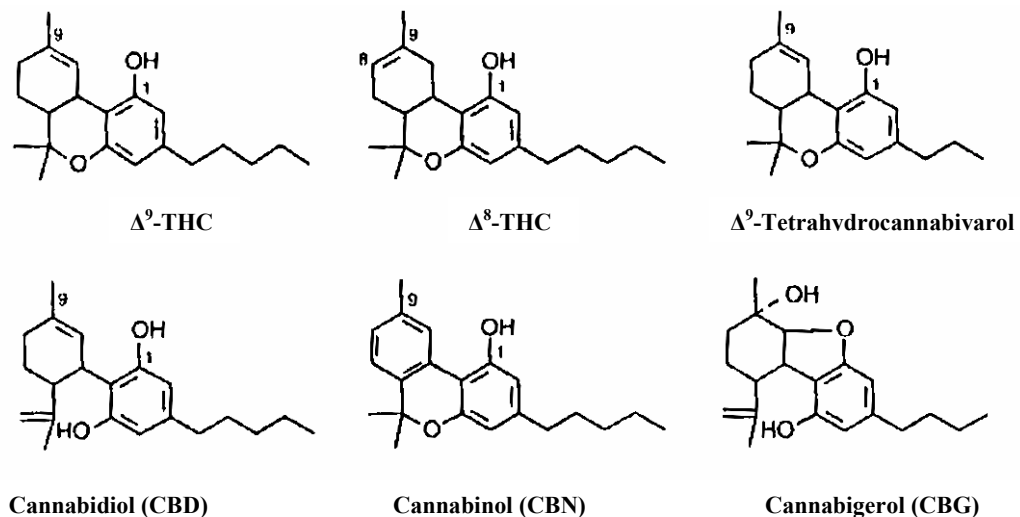


Abbildung 3.19: Darstellung einer Auswahl von Cannabinoiden (aus Drummer (5))

3.5.2 Metabolismus: Pharmakodynamik und Pharmakokinetik

Wieviel von der inhalierten Konzentration letztendlich in den Blutkreislauf gelangt, ist abhängig von der jeweiligen Erfahrung des Konsumenten beim Rauchen dieser Droge. Die Bioverfügbarkeit variiert demnach zwischen 25 und 50%; damit gelangt maximal die Hälfte des eigentlichen Wirkstoffes überhaupt in den Organismus.

Das THC verteilt sich gut in alle Organe mit höherem Fettanteil, auch ins Gehirn, dessen Blut-Hirnschranke es durch seine hydrophoben Eigenschaften gut zu durchdringen vermag. Aufgrund dieser Verteilung erfolgt die Elimination dementsprechend langsam, so dass bei Gelegenheitsrauchern Δ^9 -THC-COOH bis zu 10-20h, bei chronischen Konsumenten bis zu mehreren Tagen mittels Screeningverfahren im Urin nachgewiesen werden können.

Die Metabolisierung von THC gestaltet sich mit über 20 verschiedenen Metaboliten sehr komplex, doch ist davon nur ein geringer Anteil von Bedeutung. Wie aus folgender Abbildung (siehe unten Abbildung 3.20) ersichtlich, wird Δ^9 -THC durch Hydroxylierung in 11-Hydroxy- Δ^9 -THC umgewandelt. Dieses wird dann oxydiert zu 11-Nor-9-carboxy- Δ^9 -THC und durch Glucuronidierung weiter verstoffwechselt und als Glucuronid vorwiegend ausgeschieden.

Bei einmaligem Konsum sind Metabolite im Urin bis zu 3 Tagen nachweisbar, bei gelegentlichem Konsum (d.h. einmal pro Woche) ungefähr 30 Tage und bei Dauerabusus bis zu 80 Tagen.

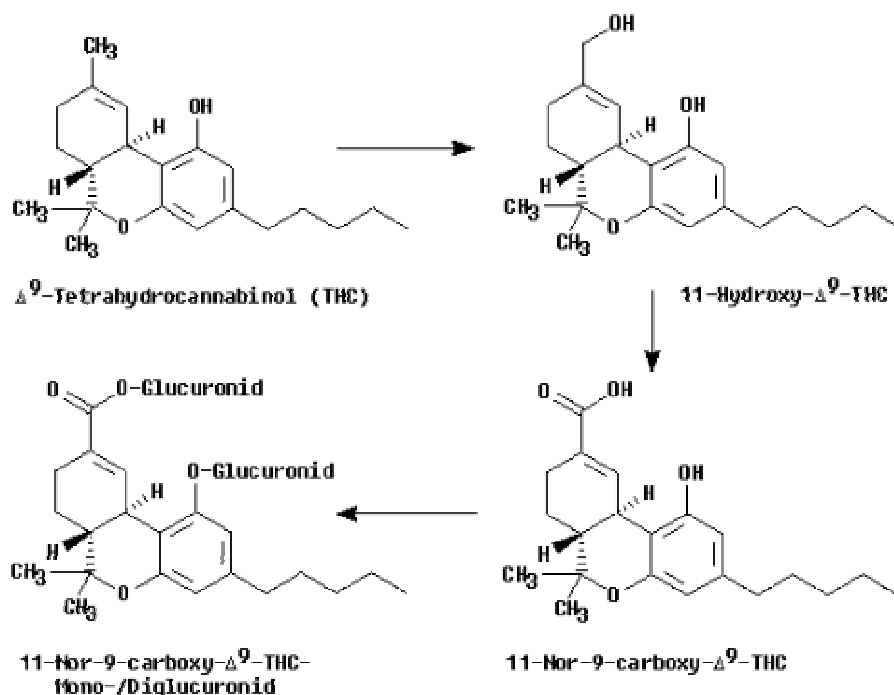


Abbildung 3.20: Darstellung des Abbauweges des THC (aus Drummer (5))

3.5.3 Erfassung der Metabolite: Assays im Vergleich

Da das 9-Carboxy- Δ^9 -THC den Hauptmetaboliten des Abbaus von THC darstellt und sich in Urin und Plasma hauptsächlich in konjugierter Form findet, versuchen die eingesetzten Enzymimmunoassays *CEDIA*, *DRI* und *Emit II*, durch die Konfiguration ihrer Antikörper vorwiegend diesen Metaboliten nachzuweisen (laut Angaben der Hersteller). Wegen der langen Eliminationszeit können die eingesetzten Assays in manchem Falle nicht einen akuten Konsum, sondern lediglich die Präsenz einer Elimination aufdecken. Damit spielt auch die Wahl des Cut-off-Wertes eine gewisse Rolle - weniger in der Studie als vielmehr drogenpolitisch und strafrechtlich in der Bewertung der Proben. Um etwaige Kreuzreaktivitäten zu anderen Substanzen oder Metabolite als 9-Carboxy- Δ^9 -THC festzustellen, wurde seitens der Hersteller ebenfalls Kreuzreaktivitätslisten für die Assays bei einem Cut-off-Wert von 50 ng/ml ausgearbeitet (siehe Tabelle 3.8):

Metabolite/EIA	CEDIA (ng/ml)	DRI (ng/ml)	Emit II (ng/ml)
11-nor-Δ^9-THC-COOH	50	50	50
11-nor-Δ^8-THC-COOH	40	100	-
Δ^9-THC	500	-	-
11-OH-Δ^9-THC	125	50	60
8β-OH- Δ^9-THC	1000	55	55
8β-11-di-OH- Δ^9-THC	500	50	55
1-Δ^9-THC-Glucuronid	62	-	-
Cannabinol	1000	100	-
Cannabidiol	1000	10000 (n)¹³	-

Tab. 3.8: Darstellung der Konzentrationen einzelner THC-Verbindungen, zur Ermittlung einer Kreuzreaktion bei einem Cut-off-Wert von 50 ng/ml für alle 3 Assays (nach Herstellerangaben (12, 13, 14))

¹³ Bei den mit (n) gekennzeichnete Konzentrationen ergab sich für die betreffende Substanz ein negatives Ergebnis bei dem jeweiligen Assay. Alle anderen Konzentrationen wurden als positiv bewertet.

Bei dieser Gegenüberstellung fällt auf, dass für den Hauptmetabolit – das 11-nor- Δ^9 -THC-COOH –, auf den die drei Assays kalibriert sind, eine 100% Kreuzreaktivität besteht. Soweit Daten von den Herstellern *DRI* und *Emit II* vorhanden sind, wird deutlich, dass diese beiden EIA in ihrem Kreuzreaktivitätsmuster sich sehr ähneln, da sie neben der Kalibratorsubstanz auch eine hohe Kreuzreaktivität zu anderen Metaboliten aufweisen im Gegensatz zum *CEDIA* (bei 11-OH- Δ^9 -THC, 8 β -OH- Δ^9 -THC, 8 β -11-di-OH- Δ^9 -THC). In Bezug auf Cannabidiol, ein weiteres Cannabinoid, kann es beim *CEDIA* Assay in einem geringen Maß zu einer Kreuzreaktion kommen, *DRI* erkennt diesen Stoff nicht als positiv, bei 11-nor- Δ^8 -THC-COOH verhält es sich ebenso, jedoch mit geringeren Konzentrationen, somit höheren Kreuzreaktivitäten.

Was die glucuronidierte Formen von Cannabinoiden anbetrifft, so gibt einzig der Hersteller von *CEDIA* eine hohe Kreuzreaktivität an, für *DRI* wie auch *Emit II* werden diesbezüglich keine Angaben gemacht, so dass ein Erkennen von glucuronidierten Formen der Δ^9 -THC Metabolite nicht gesichert ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass *DRI* und *Emit II* bei den Cannabinoiden bezüglich erwähnter Metabolite und verwandter Substanzen ähnliche Reaktionen zeigen, im Gegensatz zu *CEDIA*, was Letzterem somit interessante Eigenschaften als Kontrolltest verleiht.

4 Multisystemanalyser und Messprotokoll

4.1 BM/Hitachi 911 als Multisystemanalyser

Der BM Hitachi 911 ist ein Multisystemanalyser; das bedeutet, dass er mit einer gewissen Menge an automatisierten Schritten eine große Menge an Proben bearbeiten kann. Je nach Programmierung kann das Gerät auch mehrere Assays gleichzeitig steuern und damit die gleiche Probe mehreren Messungen unterziehen. Dies erwies sich bei dieser Studie als sehr hilfreich, da auf diese Weise die untersuchten Proben standardmäßig alle drei Assays auf einmal „durchlaufen“ konnten. Dies garantierte eine gewisse Standardisierung des Messablaufs.

Die folgende Abbildung soll die Arbeitsweise dieses Analysegerätes erläutern (siehe Abbildung 4.1).

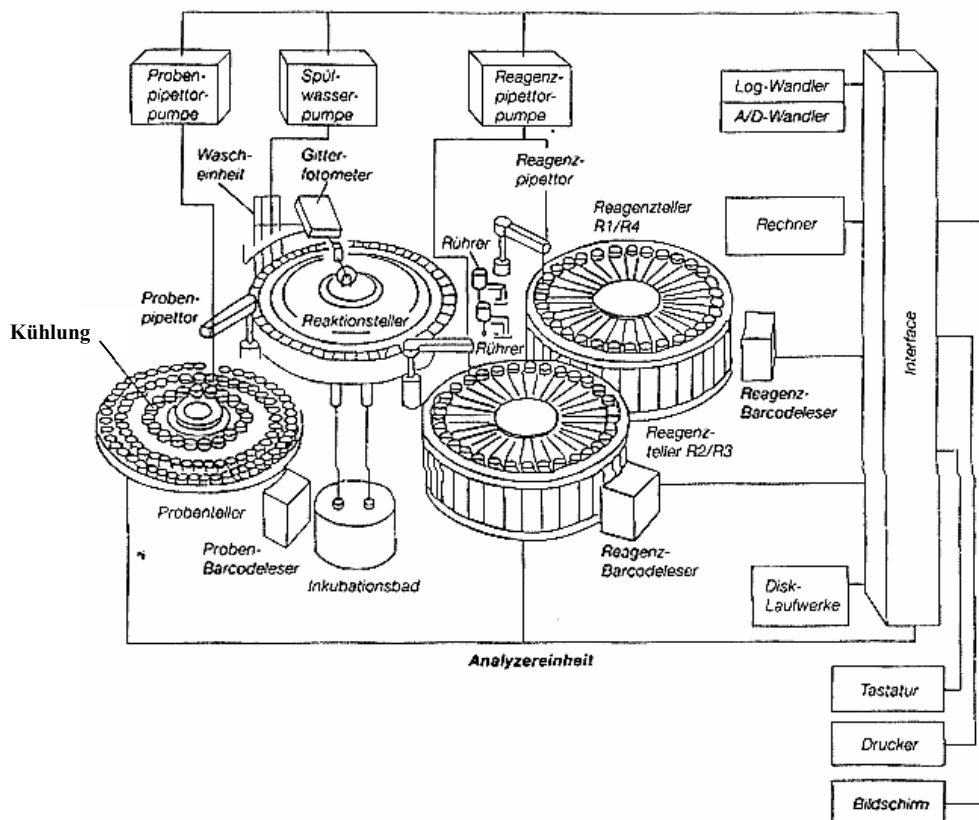


Abbildung 4.1: Schematischer Aufbau des BM Hitachi 911 Multisystemanalyzers (3)

Die hauptsächlich zur Anwendung verwendeten Baugruppen des Gerätes sind der Probensteller, der Probennehmer, der Reagenzteller, der Reaktionsteller, die Pipettoren, das Inkubationsbad, der Rührer, die Wascheinheit und das Photometer. Der Probensteller dient der Positionierung der zu messenden Proben (3).

Zu Beginn des Messvorgangs werden die einzelnen Küvetten des Reaktionstellers erst gespült und gleichzeitig mittels Photometer ihr Leerwert (der Küvetten) bestimmt. Dies wird für alle Küvetten durchgeführt, so dass im folgenden die gemessenen Leerwerte der Küvette als Referenz verwendet werden können. Daraufhin wird die Spüllösung (destilliertes Wasser) aus den Küvetten abgesaugt.

Wird eine Probe einer Messung zugeführt, so entnimmt die Probennadel eine definierte Menge an Probenflüssigkeit und gibt diese nach Umschwenken in eine vorher durch Drehung definierte Küvette des Reaktionstellers.

Zum gleichen Zeitpunkt entnimmt die Reagenzpipette auf der anderen Seite des Gerätes aus einem Reagenzteller ein vorgegebenes Volumen der vorher programmierten Lösungen (=Reagenzien) der jeweiligen Assays und gibt es in die Küvette mit der enthaltenen Probe. Daraufhin wird die Probe mit dem Reagenz gemischt und das Messsignal mittels Photometer bestimmt. Dieser Vorgang wiederholt sich mit dem zweiten Reaktionsteller ebenso, danach werden die Pipetten gespült, um erneut Reagenzien entnehmen und zu der Probe hinzupipettieren zu können.

Nach Abschluss der Messung wird das Küvettenvolumen (Probe und Reagenzien) abgesaugt, die Küvette gespült und ein neuer Leerwert gemessen. Dieser Vorgang dauert für eine Küvette ca. 16 Minuten, es können jedoch insgesamt 50 Küvetten gleichzeitig bearbeitet werden, so dass 50 Messungen binnen einer knappen Stunde erfolgen können.

Die Reagenzien sind auf den Reagenztellern an gewissen Positionen fixiert und werden ständig durch ein Kühlsystem konserviert. Da Enzyme jedoch erst ab gewissen Temperaturen voll funktionsfähig werden, ist der Reaktionsteller in ein Inkubationsbad eingebaut, welches die Küvetten auf 37°C erwärmt um einen geeignetes Milieu für den Reaktionsablauf zu schaffen.

Die Messung der Proben bei den Enzymimmunoassays erfolgt bei 340 nm. Das Photometer (siehe Abbildung 4.2) besteht aus einer 12V, 20W Halogenlampe, welche einen Lichtstrahl durch die Küvette entsendet; auf der anderen Seite wird der mehr oder weni-

ger veränderte Lichtstrahl mittels eines Konkavgitters gespalten und von einem Detektor (12 Silizium Leuchtdioden) aufgefangen, welcher in einem Spektrum von 340-800 nm differenzieren kann.

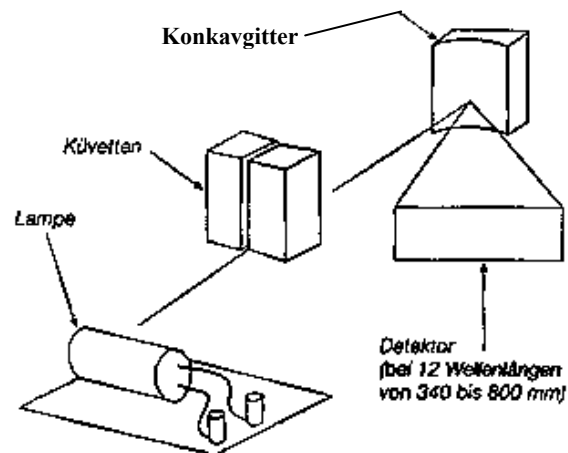


Abbildung 4.2: Schematischer Aufbau der photometrischen Messeinheit des BM Hitachi 911 (3)

4.2 Kalibration und Kontrolle

Vor der Durchführung der Messungen mussten die verschiedenen Enzymimmunoassays kalibriert werden. Da die Kalibratoren von *DRI*, *Emit II* und *CEDIA* verschieden sind, musste jedes System einzeln kalibriert werden.

Bei allen drei Systemen existieren sogenannte Multi-Drug-Urine Kalibratoren, welche mehrere Drogenmetabolite in definierten Konzentrationen enthalten, so dass die Kalibration erleichtert wird. Außer dem Metaboliten für die Cannabinoide, dem Δ 9- Tetrahydrocannabinol (Δ 9-THC), waren in den Multi-Drug-Kalibratoren die Metabolite für Amphetamine, Benzodiazepine, Opiate, Methadon und Cocain enthalten. Δ 9-THC musste bei allen drei Assays separat kalibriert werden.

Die folgende Tabelle soll die verschiedenen Kalibratoren der drei EIA's (zum einem die Substanz, mit welcher der Assay geeicht wurde und zum anderen die respektiven Eichkonzentrationen) für die einzelnen Drogenmetabolite erläutern.

Substanzklassen	Kalibratoren DRI	Kalibratoren Emit II	Kalibratoren CEDIA
Null-Kalibration	Menschlicher Negativ Urin	Menschlicher Negativ Urin	Menschlicher Negativ Urin
Benzodiazepine	Oxazepam <ul style="list-style-type: none"> • 100 ng/ml • 200 ng/ml • 500 ng/ml • 1000 ng/ml 	Oxazepam <ul style="list-style-type: none"> • 200 ng/ml • 300 ng/ml • 1000 ng/ml 	Nitrazepam <ul style="list-style-type: none"> • 200 ng/ml • 300 ng/ml • 800 ng/ml • 5000 ng/ml
Amphetamine	d-Methamphetamin <ul style="list-style-type: none"> • 500 ng/ml • 1000 ng/ml • 1500 ng/ml • 2000 ng/ml 	d-Methamphetamin <ul style="list-style-type: none"> • 1000 ng/ml • 3000 ng/ml 	d-Methamphetamin <ul style="list-style-type: none"> • 500 ng/ml • 1000 ng/ml • 3000 ng/ml • 5000 ng/ml
Opiate	Morphin <ul style="list-style-type: none"> • 300 ng/ml • 1000 ng/ml • 2000 ng/ml • 4000 ng/ml • 6000 ng/ml 	Morphin <ul style="list-style-type: none"> • 300 ng/ml • 1000 ng/ml • 2000 ng/ml • 4000 ng/ml 	Morphin <ul style="list-style-type: none"> • 300 ng/ml • 800 ng/ml • 2000 ng/ml
Methadon	Methadon <ul style="list-style-type: none"> • 150 ng/ml • 300 ng/ml • 500 ng/ml • 1000 ng/ml 	Methadon <ul style="list-style-type: none"> • 300 ng/ml • 1000 ng/ml 	Methadon <ul style="list-style-type: none"> • 300 ng/ml • 600 ng/ml • 1000 ng/ml
Cocain	Benzoyllecgonin <ul style="list-style-type: none"> • 150 ng/ml • 300 ng/ml • 500 ng/ml • 1000 ng/ml 	Benzoyllecgonin <ul style="list-style-type: none"> • 150 ng/ml • 300 ng/ml 	Benzoyllecgonin <ul style="list-style-type: none"> • 150 ng/ml • 300 ng/ml • 2000 ng/ml • 5000 ng/ml
THC	11-nor- Δ^9 -THC-9-COOH <ul style="list-style-type: none"> • 20 ng/ml • 50 ng/ml • 100 ng/ml • 200 	11-nor- Δ^9 -THC-9-COOH <ul style="list-style-type: none"> • 20 ng/ml • 50 ng/ml • 100 ng/ml • 200 ng/ml 	11-nor- Δ^9 -THC-9-COOH <ul style="list-style-type: none"> • 25 ng/ml • 50 ng/ml • 75 ng/ml • 100 ng/ml

Tab. 4.1: Vergleich der verschiedenen Kalibratoren und deren Konzentrationen (12, 13, 14)

Durch diese Kalibration konnte der BM Hitachi 911 für jede Substanzklasse eine Eichkurve erstellen, die im Folgenden für die Messungen verwendet wurde. (siehe hierzu Erläuterungen im zweiten Kapitel).

Die Überprüfung der Stabilität der Kalibratoren und der respektiven Eichkurven wurde anhand von Kontrollen mit definierten Mengen an Metaboliten durchgeführt (siehe Tabelle 4.2).

Es existierten dafür sogenannte Multi-Drug-Urine Kontrollsets, welche mehrere Kontrollanalyten in definierten Konzentrationen enthalten. In diesem Fall muss der Cannabismetabolit gesondert kontrolliert werden, und im Gegensatz zu den Kalibratoren, mussten die Opiate für *DRI* ebenfalls separat kontrolliert werden. Die restlichen Substanzen wurden für *DRI* wie *Emit II* mit den gleichen Kontrollen überprüft.

Emit II/DRI Kontrolllösungen¹⁴	Kontrolle 1 (ng/ml)	Kontrolle 2 (ng/ml)	CEDIA Kontrolllösungen¹⁴	Kontrolle 1 (ng/ml)	Kontrolle 2 (ng/ml)
➤ Oxazepam	150	300	➤ Nitrazepam	225	375
➤ d-Methamphetamin	750	1250	➤ d-Methamphetamin	750	1250
➤ Morphin	1500/225 ¹⁵	3000/375 ¹⁵	➤ Morphin	225	375
➤ Methadon	200	375	➤ Methadon	225	375
➤ Benzoylcegonin	225	375	➤ Benzoylcegonin	225	375
11-nor-Δ^9-THC-9-COOH	25	60	11-nor-Δ^9-THC-9-COOH	38	62

Tab. 4.2: Vergleich der verschiedenen Kontrollsets für DRI/Emit II versus CEDIA (12, 13, 14)

Seit Beginn der Studie wurde jede Woche eine Eichung mit anschließender Kontrolle durchgeführt. Zeigte sich in dieser Kontrolle eine Abweichung von mehr als 20 % der in der Kontrolle enthaltenen Konzentration der zu testenden Substanz, so wurde die Kontrolle wiederholt und der Assay gegebenenfalls nach dreimaliger Kontrolle erneut kalibriert.

¹⁴ Kontrolle 1 steht respektive für die Low Kontrolle, Kontrolle 2 für die High Kontrolle, somit zwei verschiedene Kontrollwerte um die Kalibration der einzelnen Assays zu überprüfen, wobei in manchen Fällen der Cut-off der einzelnen Substanzen zwischen den Wertepaaren sich befindet.

¹⁵ Die niedrigeren Kontrollwerte der beiden Kontrollen repräsentieren die separate Kontrolle des DRI Assays für die Opiate

Innerhalb der laufenden Woche wurde bei erneuten Messungen zuerst eine Kontrolle durchgeführt und bei oben genannten Abweichungen die entsprechende Substanz einem erneuten Kalibrationsdurchlauf unterzogen.

Durch die Bearbeitung des Probenmaterials im wöchentlichen Abstand, wurde praktisch vor jeder Messreihe eine Kalibration vorgenommen. Die Stabilität der Kalibrationskurve konnte demnach nur eingeschränkt beurteilt werden, da tägliche Verlaufskontrollen nicht vorgenommen wurden, doch wurde versucht, mit erneuten Kalibrationen systematische Fehler durch Schwankungen einer länger zurückliegenden Kalibration zu vermeiden.

4.3 Urinproben: von der Entnahme bis zur Messung

Alle Proben, die in dieser Studie verwendet wurden, sind im Institut für Rechtsmedizin der Universität München entnommen und aufbewahrt worden. Da die Proben in dieser Studie schon mit dem Standardscreeningverfahren (in dem Fall das *CEDIA* System) bearbeitet wurden, wurde das Untersuchungsmaterial bereits im Vorfeld auf Verfälschung durch den Patienten überprüft, um falschnegative Ergebnisse zu vermeiden.

Zu solchen Verfälschungen einer Urinprobe gehört u.a. die Verdünnung mit Wasser, die Zugabe von Essig, Kochsalz, Augentropfen, Haushaltsreiniger, Apfelsaft, Kräutertee und vielem mehr. Um diese verfälschten Urinproben zu entdecken, stehen dem Labor verschiedene Möglichkeiten wie die unten aufgezählten zur Verfügung:

- **Messung der Creatinin-Konzentration**
- **Bestimmung des Refraktionsindex**
- **Kontrolle des Urins auf Präzipitate**
- **Kontrolle von Farbe und Geruch des Urins**
- **Prüfung von pH-Wert (normal zwischen pH 6-8)**
- **Glukose (normal negativ)**
- **Azeton (normal negativ)**

Tab. 4.1: Kriterien zur Detektion verfälschter Urinproben (1)

Die Urinproben sind also diesen Voruntersuchungen unterzogen und schon einmal mit dem *CEDIA* Verfahren bearbeitet worden. Demnach erfolgte die Einteilung in positive und negative Proben mit chromatographischer Überprüfung.

Damit die Assays *DRI* und *Emit II* verglichen werden konnten, wurden dieselben Proben nochmals mit dem *CEDIA* Verfahren getestet, wobei sich ein identisches Ergebnis zu der ersten Untersuchung des Probenmaterials herausstellte. Daraufhin wurden die Proben in Positiv- und Negativurine unterteilt und mit den Assays *DRI* und *Emit II* „gescreent“.

4.4 Drei Testverfahren in einem Messdurchlauf: das Versuchsprotokoll

Nach Kalibration und Kontrolle der Assays konnte der eigentliche Messdurchlauf gestartet werden. Dafür wurden jeweils 50 Proben in Serie getestet, wobei jedem Uringefäß 200 µl entnommen und in ein Probengefäß auf dem Probenteller positioniert wurde. Somit stand ausreichend Probenmaterial zur Verfügung um mehrere Metabolite anhand der drei Assays nachzuweisen. Da mehrere Urine von Patienten stammten, die mehrere Stoffe konsumiert hatten, konnten mit Hilfe einer Probe häufig mehrere Substanzen erfasst werden.

Wie bereits oben erwähnt wurden die Urinproben nochmals mittels dem *CEDIA* Verfahren in Positiv- und Negativurine unterteilt. Daraufhin konnten die Proben mit dem BM Hitachi 911 gleichzeitig durch die Assays *DRI* und *Emit II* gescreent werden. Hieraus resultiert ein direkter Vergleich der Konzentrationen der Assays für die jeweilige Probe. Messfehler bezüglich der Konzentrationsabnahme von Substanzen in der getesteten Probe durch chemische Zersetzung im Laufe der Zeit konnten auf diese Weise vermieden werden.

Zusammenfassend bestand das Messprotokoll in einem ersten Schritt aus der Kalibration der jeweiligen Assays auf die im folgendem zu testenden Substanzen. Dann wurde regelmäßig eine Kontrolle durchgeführt, um Kalibrationsfehler und Instabilitäten zu detektieren und zu beheben. Hierauf wurden die Proben mittels *CEDIA* auf die jeweiligen im Urin enthaltenen Metabolite getestet und dem Ergebnis nach in positive und negative Urine unterteilt. Der für die Studie bedeutendste Schritt, nämlich der Vergleich zwischen *DRI* und *Emit II*, wurde zuletzt durchgeführt.

5 Ergebnisse und statistische Auswertung

5.1 Datenerfassung

Die Studie zum Vergleich der zwei oben genannten Enzymimmunoassays wurde im Zeitraum vom 01.12.1999 bis 01.03.2000 durchgeführt.

Es galt festzustellen, inwiefern sich die verschiedenen Enzymimmunoassays (EIA) *DRI* und *Emit II* sowohl qualitativ als auch korrelativ zu einander verhalten. An erster Stelle stand die qualitative Aussagekraft des EIA *Emit II* zu *DRI*, in einem zweiten Teil wurden bei einigen Substanzen auch versucht, eine Korrelation zwischen den Assays zu erstellen.

Es wurden insgesamt 567 Urinproben analysiert, welche in oben genannten Zeitraum im Institut zur Verfügung standen. Dazu gehörten auch Proben, welche bereits vor dem Testzeitraum entnommen wurden, jedoch nicht länger als sechs Monate zuvor. Diese sowohl positiven als auch negativen Urine wurden bereits vorab mit dem *CEDIA* System routinemäßig bearbeitet. Es handelte sich dabei um Proben, welche aus Bewährungs-, Polizei- oder Leichenurinen entnommen wurden.

Die oben erwähnten Proben wurden auf 6 verschiedene Substanzen beziehungsweise deren respektive Metabolite im Urin getestet; dabei entfielen:

- 211 Proben auf Benzodiazepine
- 204 Proben auf Amphetamine
- 222 Proben auf Opiate
- 203 Proben auf Methadon
- 200 Proben auf Cocain
- 213 Proben auf THC.

Das Erfassen der Testergebnisse wurde auf dem BM Hitachi BM 911 durchgeführt.

5.2 Qualitative und korrelative Ergebnisse

5.2.1 Grundbegriffe der Statistik zum Vergleich qualitativer Daten

Um eine qualitative Aussage treffen zu können, wurde der Cut-off-Wert als Entscheidungskriterium zwischen einer positiven und einer negativen Probe verwendet. Dies bedeutet nicht – wie bereits beschrieben-, dass in dieser Probe keine Metaboliten vorhanden sind. Es wurde jedoch festgelegt, dass ab der mit dem Cut-off-Wert erreichten Konzentration des zu bestimmenden Stoffes die Probe als positiv zu bewerten ist (siehe dazu auch 2.3.4). Die folgende Abbildung stellt eine Vierfeldertafel dar, anhand der die anschließenden Berechnungen erstellt wurden (10).

Opi DRI			
Opi Emit	negativ	positiv	Gesamt
negativ	Richtig neg. (rn)	Falsch pos. (fp)	$R_n + f_p$
positiv	Falsch neg. (fn)	Richtig pos. (rp)	$F_n + r_p$
Gesamt	$R_n + f_n$	$F_p + r_p$	Proben gesamt

Tab. 5.1: exemplarische Tabelle zur Erläuterung nachfolgender Ergebnisse

Man bezeichnet als richtig positiv die Proben, welche von beiden Enzymtesten Resultate oberhalb des Cut-Off-Wertes – bzw. ihn mit eingeschlossen – ergeben haben.

Als richtig negativ definiert man dementsprechend die Werte unterhalb der festgelegten Grenze, welche bei beiden EIA ermittelt wurden (10).

Falsch negative Werte entstehen, wenn der zu beurteilende Test – in dem Fall das *DRI* System – ein negatives, die Kontrolle – das *Emit II* System – jedoch ein positives Ergebnis liefert.

Genau umgekehrt ist es mit „falsch positiven“ Ergebnissen, wobei das *DRI* System eine Probe als positiv bewertet, sie nach der Kontrolle aber als negativ bewertet wird.

Zur statistischen Beurteilung werden folgende Begriffe verwendet: Sensitivität, Spezifität, positiv und negativ prädikativer Wert (10).

Die Sensitivität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit, mit der eine Probe als positiv erkannt wird. Dementsprechend gilt die Spezifität als diejenige Wahrscheinlichkeit, mit der eine Probe als negativ erkannt wird (10).

Der prädikative Wert besagt, mit wie viel Wahrscheinlichkeit die positiven oder negativen Proben vorliegen, wenn aus Referenztest die Positivität oder Negativität eindeutig festgestellt wurde (10).

Dies bedeutet für die in dieser Dissertation hervorgehobenen Fragestellung, dass die Sensitivität berücksichtigt, in wieviel Prozent der Fälle das *DRI* System im Vergleich zum *Emit II* eine positive Probe erfassen kann. Der positiv prädikative Wert hingegen macht eine Angabe über die Wahrscheinlichkeit, mit welcher das *DRI* System einen real positiven Befund auch signifikant nachweisen würde.

Die Spezifität gibt eine Aussage, in wieviel Prozent der Fälle eine Probe aus dem Kontrolltest beim *DRI* Verfahren als negativ erkannt wurde. Der Negativ prädikative Wert zeigt, wie sicher der Test eine negative Probe auch als negativ erfassen würde.

Zur Ermittlung der oben erwähnten statistischen Werte dienen folgende Formeln:

Sensitivität	$\frac{\text{richtig positive Werte}}{(\text{richtig positive} + \text{falsch negative Werte})}$
Spezifität	$\frac{\text{richtig negative Werte}}{(\text{richtig negative} + \text{falsch positive Werte})}$
Positiv prädikativer Wert	$\frac{\text{richtig positive}}{(\text{falsch positive} + \text{richtig positive Werte})}$
Negativ prädikativer Wert	$\frac{\text{Richtig negative}}{(\text{falsch negative} + \text{richtig negative Werte})}$

Tab. 5.2: Darstellung statistischer Parameter und deren Berechnung

5.2.2 Kontrolle diskrepanter Ergebnisse

Es ergaben sich bei Erhebung der Daten auch falsch negative oder positive Befunde im Vergleich vom *DRI* zum *Emit II* Enzymimmunoassay. Um diese diskrepanten Ergebnisse auf ihre Richtigkeit hin zu überprüfen und die Performance des *DRI* Systems zu

bewerten, wurden die gesamten Proben nochmals durch einen Kontrolltest, dem beschriebenen *CEDIA* Enzymimmunoassay, bewertet. Die Ergebnisse wurden dann mit denen der statistischen Erhebung von *DRI* und *Emit II* System verglichen, um bezüglich des *DRI* Verfahrens eine eindeutige Aussage treffen zu können.

5.2.3 Korrelative Daten

Des Weiteren wurde bei einigen Substanzen versucht, eine Korrelation zu ermitteln. Dies war allerdings nur möglich bei den Substanzen, welche eine angemessene Anzahl von Werten zwischen dem Cut-Off- und dem Maximalwert ($n > 20$) aufwiesen, um eine statistische Aussage treffen zu können. Diese wurden infolgedessen anhand eines Diagramms und möglichen Regressionskurven verglichen, wie zum Beispiel in folgender Abbildung:

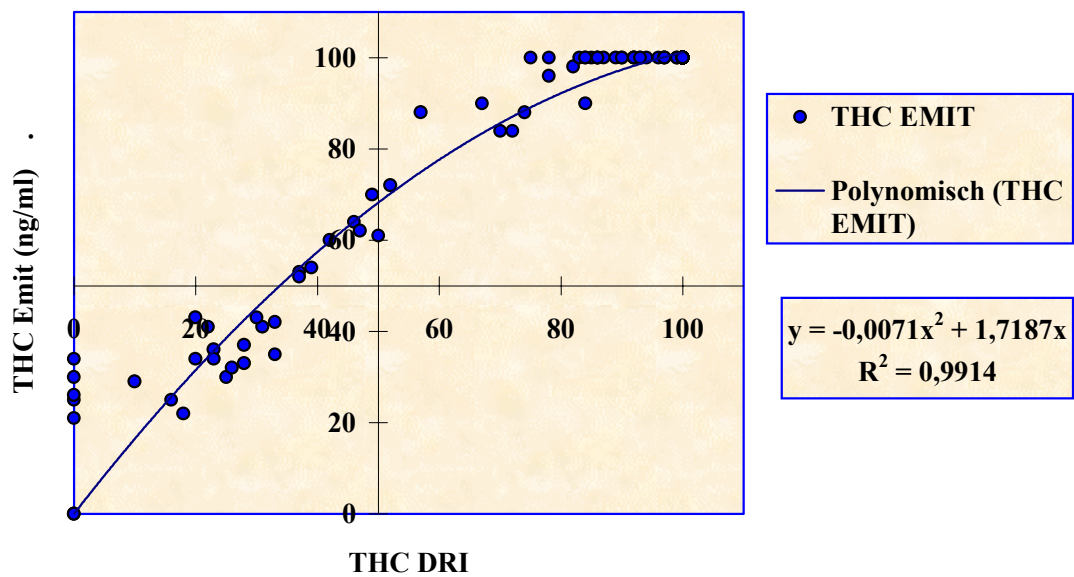


Abbildung 5.1: exemplarische Abbildung zur Erläuterung nachfolgender korrelativer Vergleiche

5.3 Statistische Ergebnisse der Studie

5.3.1 Benzodiazepine und ihre Metabolite

Messprotokoll

In der Gruppe der Benzodiazepine wurden insgesamt 211 Urinproben im Vergleich auf den zwei EIA Systemen *CEDIA*, *DRI* und *Emit II* getestet.

Der Cut-Off-Wert wurde zur besseren statistischen Aussagekraft für die zwei Systeme einheitlich festgelegt.

Der Wert beträgt für die Benzodiazepine 200 ng/ml.

Aufgrund des oben genannten Wertes wurden im *Emit II* Verfahren, welches als Referenz gegenüber dem *DRI* EIA fungiert, 84 Proben als positiv auf Benzodiazepine, bzw. deren Metabolite im Urin getestet.

Qualitative Auswertung

Das Ergebnisse des Vergleichstest *DRI* lautet wie folgt:

Benz DRI				
Benz Emit	negativ	positiv	Gesamt	
negativ	121	6	127	Sensitivität = 82/84 = 97,6 %
positiv	2	82	84	Spezifität = 121/127 = 95,2 %
Gesamt	123	88	211	Pos. Präd. Wert = 93,1 % Neg. präd. Wert = 98,3 %

Tab. 5.3: Qualitative Auswertung von *DRI* versus *Emit II* für die Benzodiazepine

Die Kontrolle mit *CEDIA* ergab folgende Ergebnisse:

Benz DRI				
Benz CEDIA	negativ	positiv	Gesamt	
				Sensitivität = 86/89 = 96,6 %
negativ	120	2	122	Spezifität = 120/122 = 98,3 %
positiv	3	86	89	Pos. präd. Wert = 97,7 %
Gesamt	123	88	211	Neg. präd. Wert = 97,5 %

Tab. 5.4: Qualitative Auswertung von *DRI* versus *CEDIA* für die Benzodiazepine

Benz Emit				
Benz CEDIA	negativ	positiv	Gesamt	
				Sensitivität = 84/89 = 94,3 %
negativ	122	0	122	Spezifität = 122/122 = 100,0 %
positiv	5	84	89	Pos. präd. Wert = 100,0 %
Gesamt	127	84	211	Neg. präd. Wert = 96,0 %

Tab. 5.5: Qualitative Auswertung von *Emit II* versus *CEDIA* für die Benzodiazepine

Bewertung

Bei Betrachtung der oben vorliegenden Ergebnisse fällt auf, dass alle Ergebnisse sich im Bereich oberhalb 90 % befinden (siehe Tab. 5.3).

Dennoch bemerkt man, dass der *DRI* EIA zwar eine sehr gute Sensitivität aufweist mit 97,6 %, aber ein positives Ergebnis nur in 93,1 % der Fälle voraussagen kann.

Umgekehrt verhält sich dies jedoch bei den negativen Werten, wo er zwar nur in 95,2% der Fälle eine negative Probe erkennt, aber voraussichtlich er kaum eine positive Probe als negativ verkennen würde.

Um dieser Diskrepanz nachzugehen, wurde bei diesem Metaboliten der *CEDIA* Assay als Referenz hinzugezogen (siehe Tab. 5.4 und 5.5). Dabei ergab sich, dass *DRI* eine

Spezifität von 98,3 % bei einem negativ prädikativen Wert von 97,5 % in Bezug auf *CEDIA* erbrachte. *Emit II* hingegen wies eine Spezifität von 100 % bei einer negativen Vorhersagewahrscheinlichkeit von 96% auf. Bei Ermittlung des positiv prädikativen Wertes lag *Emit II* mit 100 % vor dem *DRI* Assay mit 97,7 %.

Diese Konstellation von Ergebnissen beweist, dass für die Benzodiazepine keine eindeutige Entscheidung zur besseren qualitativen Aussagekraft bezüglich eines der beiden Testverfahren gemacht werden kann. Aufgrund der Werte im Bereich über 95 % sind beide Assays sicherlich zur Ermittlung geeignet; doch weisen sie gegenüber *CEDIA* gewisse Fehlerquoten auf. *Emit II* liefert eine höhere Anzahl von falsch negativen Werten, bei *DRI* entsteht der Fehler aufgrund mehrerer falsch positiver Resultate. Dies sorgt infolgedessen für diese eigenartige Ergebnisdarstellung, welche eine eindeutige Präferenz des einen Systems gegenüber dem anderen nicht zulässt.

Korrelative Daten

Aufgrund einer größeren Anzahl von Werten zwischen dem Cut-Off Wert und dem höchsten für die zwei Systeme einheitlich festgelegten Wert, kann versucht werden, anhand folgenden Diagramms eine Beziehung zwischen *DRI* und *Emit II* für die Benzodiazepine zu etablieren:

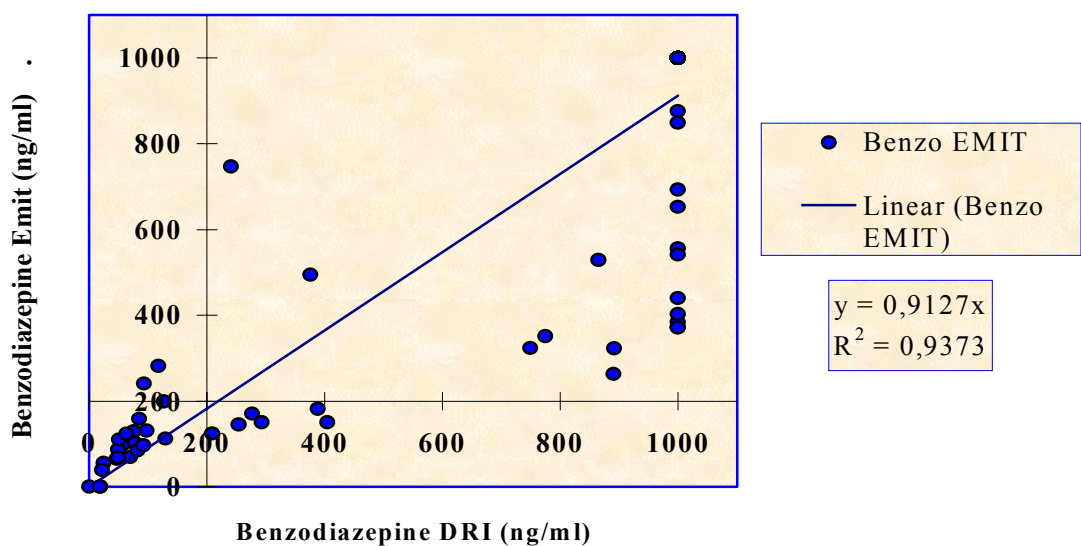


Abbildung 5.2: Benzodiazepine – Relation zwischen *DRI* und *Emit II*

Bewertung

Wie aus obigen Diagramm ersichtlich ergibt sich zwischen dem Cut-Off- und dem Höchstwert keine Möglichkeit einer korrelativen Auswertung. Wohl wurde versucht, eine Gerade zu legen, jedoch weisen die beiden Systeme im Vergleich eine so große Streuung auf, dass sich nahezu keine Summe von Punkten in der Nähe der Gerade befindet.

So kann man sagen, dass für die Benzodiazepine der *DRI* genauso wie auch das *Emit II* System eine qualitative Aussage ermöglichen, verglichen mit dem *CEDIA* Assay jedoch Schwächen zeigen. Eine korrelative Aussage wird wegen der oben aufgeführten Ergebnisse nicht möglich sein.

5.3.2 Amphetamine und ihre Metabolite

Messprotokoll

In der Gruppe der Amphetamine wurden insgesamt 204 Urinproben im Vergleich auf den zwei EIA Systemen *DRI* und *Emit II* getestet.

Der Cut-off-Wert wurde hier ausnahmsweise verändert auf Werte, welche vom Hersteller als möglich angegeben wurden und auch in der Literatur zu finden sind (12, 13, 14, 28). Diese Werte entsprechen auch ggf. den verschiedenen Kalibratoren für die Amphetamine.

Das System wurde mit folgenden Cut-Off-Werten ausgewertet:

-300 ng/ml

-500 ng/ml

-1000 ng/ml

Aufgrund der oben genannten Werte wurden im *Emit II* Verfahren, welches als Referenz gegenüber dem *DRI* EIA fungiert, sowohl 79, 74 als auch 64 Proben als positiv auf Amphetamine, beziehungsweise deren Metabolite im Urin getestet.

Qualitative Auswertung

Die Ergebnisse des Vergleichstest *DRI* sind in folgender, zu den restlichen Tabellen der Statistik abweichender Tabelle wiedergegeben:

Cut-off (ng/ml)	300	500	1000
Sensitivität	98,7 %	100 %	98,5 %
Spezifität	92,8 %	96,1 %	96,3 %
Positiv prädi- kativer Wert	89,6 %	93,6 %	92,9 %
Negativ prädi- kativer Wert	99,1 %	100 %	99,2 %

Tab. 5.6: Qualitative Auswertung von *DRI* versus *Emit II* für die Amphetamine bei verschiedenen Cut-off Werten

Die Kontrolle mit *CEDIA* bei einem Cut-off von 500 ng/ml ergab folgende Ergebnisse:

Amp DRI	negativ	Positiv	Gesamt	
Amp CEDIA				Sensitivität = 71/73 = 97,2 %
negativ	123	8	131	Spezifität = 123/131 = 93,8 %
positiv	2	71	73	Pos. prädi. Wert = 89,1 %
Gesamt	125	79	204	Neg. prädi. Wert = 98,4 %

Tab. 5.7: Qualitative Auswertung von *DRI* versus *CEDIA* für die Amphetamine

Amp Emit				Sensitivität = 69/73 = 94,5 %
Amp CEDIA	negativ	Positiv	Gesamt	
negativ	125	6	131	Spezifität = 125/131 = 95,4 %
positiv	4	69	73	Pos. präd. Wert = 92,0 %
Gesamt	129	75	204	Neg. präd. Wert = 96,8 %

Tab. 5.8: Qualitative Auswertung von *Emit II* versus *CEDIA* für die Amphetamine

Bewertung

Zur qualitativen Aussage lässt sich sagen, dass aufgrund des wechselnden Cut-Offs die Anzahl der positiven Werte für das *Emit II* System wechselt. Dementsprechend von Bedeutung ist die Beobachtung, dass bei allen drei Cut-Off-Werten die Ergebnisse über 90% liegen – mit Ausnahme des positiv prädikativen Wert bei dem Cut-Offs von 300 ng/ml.

Nichts desto trotz fällt auf, dass nach intensiven Vergleichen der Wertepaare der mittlere Cut-off-Wert mit 500 ng/ml einen Vergleich der beiden Systeme am besten ermöglicht.

Mit 100 % Sensitivität hat er jede positive Probe auch als solche erkannt Außerdem findet sich in der Wahrscheinlichkeitsvorhersage einer Probe bei den beiden Assays mit positiv und negativ prädikativen Wert eine sehr gute Übereinstimmung gegenüber den anderen Cut-off Berechnungen.

Nur die Erkennung der negativen Proben betreffend, erweist sich der höchste Cut-off-Wert mit 96,3 % um 0,2 % von Vorteil. Dies ist nicht verwunderlich, da man bedenken muss, dass bei diesem Schwellenwert eine große Anzahl an Proben nicht einmal als positiv erfasst wird, obwohl sie dennoch Metaboliten enthalten (insgesamt 64 Stück).

Im Vergleich zum *CEDIA* Assay mit einem Cut-Off von 500 ng/ml sinkt jedoch die qualitative Aussagekraft der anderen beiden Enzymimmunoassays. *DRI* erreicht bei denselben Proben nur 97,2 % Sensitivität bei einer positiven Vorhersagewahrscheinlichkeit von 89 %, das *Emit II* System zeigt ebenfalls niedrigere Werte (Sen-

sitivität = 94,5 %, positiv prädikativer Wert = 92 %). Ebenso verhalten sich die Assays bei negativen Proben (*Emit II* Spezifität 95,4 % bei negativ prädikativen Wert von 96,8% wie auch das *DRI* System mit 93,8 % und 98,4 %).

Grund für diese schlechteren Ergebnisse sind für *DRI* die falschpositiven bzw. für das *Emit II* Verfahren die falsch negativen Probenzahlen, welche Sie letztendlich vom *CEDIA* Assay unterscheiden (siehe Tab. 5.7 und 5. 8)¹⁶.

Dennoch lassen diese Ergebnisse die Schlussfolgerung zu, dass für die Amphetamine die Assays *DRI* und *Emit II* bei einem gemeinsamen Cut-Off von 500 ng/ml in ihrer qualitativen „Performance“ gut korrelierbar sind.

Korrelative Daten

Aufgrund einer größeren Anzahl von Werten zwischen dem Cut-off-Wert und dem höchsten für die zwei Systeme einheitlich festgelegten Wert, kann versucht werden, anhand folgenden Diagramms eine Beziehung zwischen *DRI* und *Emit II* für die Amphetamine zu etablieren:

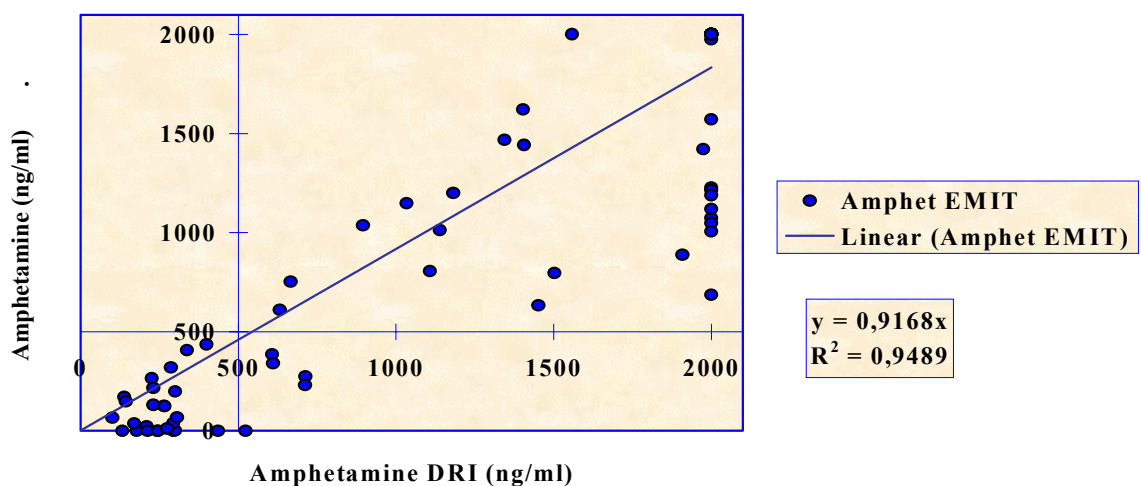


Abbildung 5.3: Amphetamine – Relation zwischen *DRI* und *Emit II*

¹⁶ Die Statistik der Amphetamine zeigt, in Anlehnung an Kapitel 2.3.4, dass die Wahl des Cut-off-Wertes eine entscheidende Bedeutung für die Auswertung besitzt. Die Selektion von positiven wie auch negativen Ergebnissen und dementsprechend die Zunahme von falschpositiven oder –negativen Werten je nach unterschiedlichen Cut-off verstärkt die Notwendigkeit einer sorgfältigen Auswahl dieser Entscheidungsgrenze, damit das infolgedessen eingesetzte Testverfahren ein möglichst wahrheitsgetreues Ergebnis liefert.

Bewertung

Da sich der Cut-off um 500 ng/ml in oben aufgeführter qualitativer Auswertung bewährt hatte, wird er in dem Diagramm auch als Ausgangspunkt für die korrelative Auswertung verwendet.

Hierbei stellt sich heraus, dass sich im Bereich zwischen dem Cut-off und dem Höchstwert, welcher bei den beiden Systemen einheitlich auf 2000 ng/ml fixiert wurde, die Werte zwischen 500 und 1500 relativ nahe an eine mögliche Regressionsgerade annähern. Nach 1500 ng/ml steigt die Streuung mit zunehmender Annäherung an den Höchstwert. Überzeugend ist diese Aussage jedoch nicht, da sich in der Statistik zu wenige Werte in diesem Bereich befinden, welche die Hypothese belegen würden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das *DRI* im Vergleich zum *Emit II* Verfahren für die Amphetaminen bei 500 ng/ml die größte Vergleichbarkeit aufweist – qualitativ gesehen, bei der korrelativen Auswertung jedoch nur eine Hypothese bezüglich einer Aussage dieses Enzymimmunoassay aufgestellt werden kann.

5.3.3 Opiate und ihre Metabolite

Messprotokoll

In der Gruppe der Opiate wurden insgesamt 222 Urinproben vergleichsweise mit den zwei EIA Systemen *DRI* und *Emit II* getestet.

Der Cut-Off-Wert wurde zur besseren statistischen Aussagekraft für die zwei Systeme einheitlich festgelegt.

Der Wert beträgt bei den Opiaten 300 ng/ml.

Aufgrund des oben genannten Wertes wurden im *Emit II* Verfahren, welches als Referenz gegenüber den *DRI* EIA fungiert, 106 Proben als positiv auf Opiate, beziehungsweise deren Metabolite im Urin ermittelt.

Qualitative Auswertung

Das Ergebnis des Vergleichstests *DRI* lautet wie folgt:

Opi DRI				
Opi Emit	negativ	positiv	Gesamt	
				Sensitivität = $106/106 =$ 100 %
negativ	111	5	116	Spezifität = $111/116 =$ 95,6 %
positiv	0	106	106	Pos. präd. Wert = 95,4 %
Gesamt	111	111	222	Neg. präd. Wert = 100 %

Tab. 5.9: Qualitative Auswertung von *DRI* versus *Emit II* für die Opiate

Die Kontrolle mit *CEDIA* ergab folgende Ergebnisse::

Opi DRI				
Opi CEDIA	negativ	positiv	Gesamt	
				Sensitivität = $108/110 =$ 98,1 %
negativ	110	2	112	Spezifität = $110/112 =$ 98,2 %
positiv	2	108	110	Pos. präd. Wert = 98,1 %
Gesamt	112	110	222	Neg. präd. Wert = 98,2 %

Tab. 5.10: Qualitative Auswertung von *DRI* versus *CEDIA* für die Opiate

Opi Emit				Sensitivität = 105/110 = 95,4 %
Opi CEDIA	negativ	positiv	Gesamt	
negativ	112	0	112	Spezifität = 112/112 = 100 %
positiv	5	105	110	Pos. präd. Wert = 100 %
Gesamt	117	105	222	Neg. präd. Wert = 95,7 %

Tab. 5.11: Qualitative Auswertung von *Emit II* versus *CEDIA* für die Opiate

Bewertung

Bei Betrachtung der oben vorliegenden Ergebnisse fällt auf, dass alle Ergebnisse sich im Bereich oberhalb von 90 % befinden.

Dennoch ist zu bemerken, dass der *DRI* EIA zwar eine exzellente Sensitivität aufweist, jedoch ein positives Ergebnis nur in 95,4 % der Fälle vorhersagen kann. Im Vergleich zum *CEDIA* System als Kontrolle weist der *DRI* Enzymimmunoassay einen positiv prädikativen Wert von 98,1 % bei demselben Probenspektrum auf, was ihm als EIA eine sichere Vorhersagequalität ermöglicht.

Umgekehrt verhält er sich bei den negativen Werten, wo er im Vergleich zu *Emit II* nur in 95,6 % der Fälle eine negative Probe erkennt hat; vermutlich würde er aber keine positive Probe als negativ verkennen. Ebenso weist das *DRI* System im Vergleich zum *CEDIA* eine Spezifität von 98,1 % auf.

Die qualitativ schlechteren Ergebnisse von *DRI* versus *Emit II* sind demnach darauf zurückzuführen, dass der *Emit II* Assay eine höhere Anzahl von falschnegativen Werten im Vergleich zum *CEDIA* liefert, was sich infolgedessen auf den Vergleich mit dem *DRI* System auswirkt (siehe Tab. 5.10 und 5.11).

Korrelative Daten

Aufgrund einer größeren Anzahl von Werten zwischen dem Cut-off-Wert und dem höchsten für die zwei Systeme einheitlich festgelegten Wert, kann versucht werden, anhand folgenden Diagramms eine Beziehung zwischen *DRI* und *Emit II* für die Opiate zu etablieren:

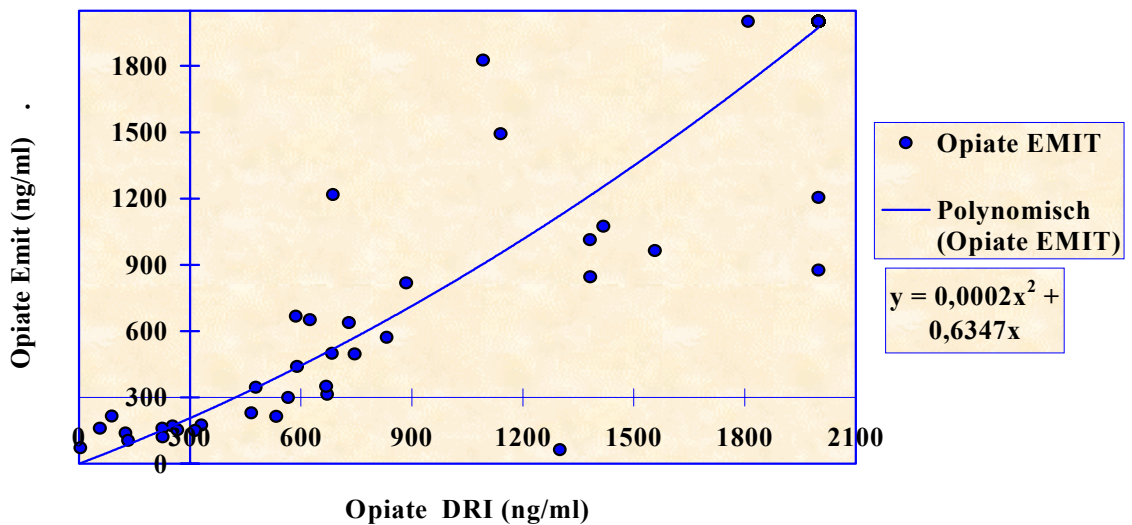


Abbildung 5.4: Opiate – Relation zwischen *DRI* und *Emit II*

Bewertung

Bei vorliegendem Diagramm ist erkennbar, dass im Bereich von 300 - 2000 ng/ml die Werte für eine korrelative Auswertung nicht gegeben sind. Man bemerkt, dass gerade in diesem Bereich eine große Streuung besteht, welche sich mit einer polynomischen Trendkurve zwar nähern, jedoch nicht verbinden lässt. Am ehesten könnte man um den Cut-off-Wert eine größere Gruppierung an Werten festlegen, welche eine gewisse Tendenz ergäben, jedoch keine mathematischen Korrelation.

5.3.4 Methadon

Messprotokoll

In der Gruppe des Methadons wurden insgesamt 203 Urinproben vergleichsweise auf den zwei EIA Systemen *DRI* und *Emit II* getestet.

Der Cut-Off-Wert wurde zur besseren statistischen Aussagekraft für beide Systeme einheitlich festgelegt.

Der Wert beträgt wie bei den Opiaten 300 ng/ml.

Aufgrund des oben genannten Wertes wurden im *Emit II* Verfahren, welches als Referenz für das *DRI* EIA verwendet wird, 84 Proben als positiv auf Methadon, beziehungsweise dessen Metabolite im Urin getestet.

Qualitative Auswertung

Das Ergebnis des Vergleichstests *DRI* lautet wie folgt:

Met DRI				
Met Emit	negativ	Positiv	Gesamt	
negativ	113	6	119	Sensitivität = 84/84 = 100 %
positiv	0	84	84	Spezifität = 113/119 = 94,9 %
Gesamt	113	90	203	Pos. präd. Wert = 93,3 % Neg. präd. Wert = 100 %

Tab. 5.12: Qualitative Auswertung von *DRI* versus *Emit II* für Methadon

Die Kontrolle mit *CEDIA* ergab folgende Ergebnisse:

Met DRI				
Met CEDIA	negativ	positiv	Gesamt	
				Sensitivität = 90/93 = 96,3 %
negativ	110	0	110	Spezifität = 110/110 = 100 %
positiv	3	90	93	Pos. präd. Wert = 100 %
Gesamt	113	90	203	Neg. präd. Wert = 97,3 %

Tab. 5.13: Qualitative Auswertung von *DRI* versus *CEDIA* für Methadon

Met Emit				
Met CEDIA	negativ	positiv	Gesamt	
				Sensitivität = 84/93 = 90,3 %
negativ	110	0	110	Spezifität = 110/110 = 100 %
positiv	9	84	93	Pos. präd. Wert = 100 %
Gesamt	119	84	203	Neg. präd. Wert = 92,4 %

Tab. 5.14: Qualitative Auswertung von *Emit II* versus *CEDIA* für Methadon

Bewertung

Bei Betrachtung der oben vorliegenden Ergebnisse fällt auf, dass sich alle Ergebnisse im Bereich oberhalb von 90 % befinden.

Dennoch fällt auf, dass der *DRI* EIA zwar mit 100 % eine gute Sensitivität aufweist, ein positives Ergebnis aber nur in 93,3 % der Fälle voraussagen kann.

Umgekehrt verhält er sich jedoch bei den negativen Werten, wo er nur in 94,9% der Fälle eine negative Probe erkennt, vermutlich würde er jedoch keine positive Probe als negativ erkennen.

Fügt man diesen Beobachtungen die Ergebnisse des Vergleichs der beiden Systeme mit dem *CEDIA* Verfahren hinzu, so zeigt sich erneut der *DRI* EIA als der qualitativ aussa-

gekräftigere. Bei dem Vergleich ergab sich auch, dass beide Systeme einen positiv prädikativen Wert von 100% gegenüber dem *CEDIA* aufwiesen. Das *DRI* System im Vergleich zum *CEDIA* zeigte eine hundertprozentige Spezifität mit einem negativ prädikativen Wert von 97,3%. Das *Emit II* System hingegen ergab – den gleichen Proben unterzogen – zwar ebenfalls eine Spezifität von 100 %, jedoch einen negativ prädikativen Wert von nur 92,4 %.

Diese Resultate ergaben sich dadurch, dass Proben, welche sowohl vom *CEDIA* als auch vom *DRI* als positiv erkannt wurden, beim *Emit II* System negativ gewertet wurden (siehe Tab. 5.13 und 5.14).

Somit ist der *DRI* Assay in Hinblick auf die qualitative Aussagekraft dem *Emit II* überlegen.

Korrelative Daten

Aufgrund einer größeren Anzahl von Werten zwischen dem Cut-off-Wert und dem höchsten für die zwei Systeme einheitlich festgelegten Wert, kann versucht werden, anhand folgenden Diagramms eine Beziehung zwischen *DRI* und *Emit II* für Methadon zu etablieren:

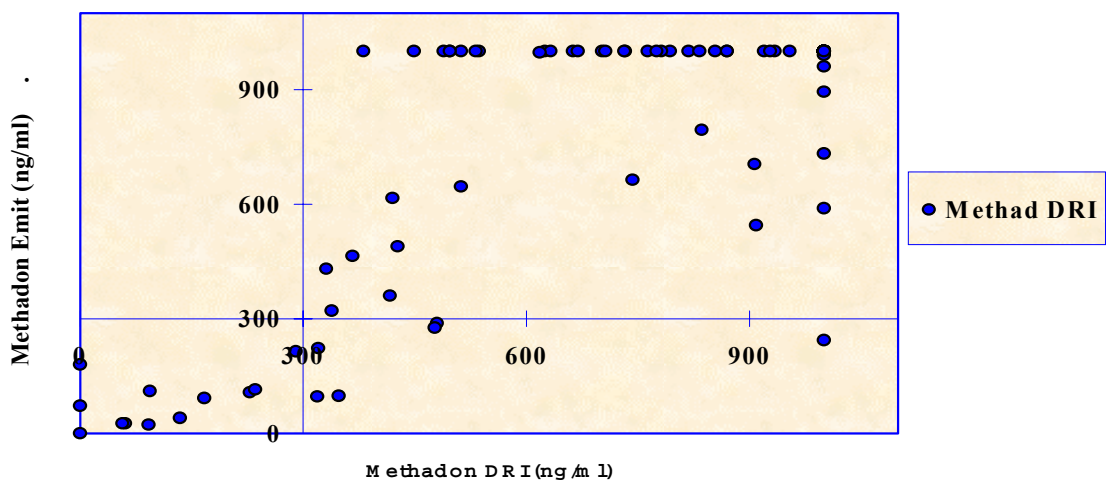


Abbildung 5.5: Methadon – Relation zwischen *DRI* und *Emit II*

Bewertung

Bei vorliegendem Diagramm lässt sich erkennen, dass im Bereich von 300 - 2000 ng/ml die Werte für einen korrelativen Vergleich nicht geeignet sind. Man bemerkt, dass in diesem Bereich eine besonders große Streuung besteht, welche sich mit einer etwaigen Regressionskurve nicht verbinden lassen würde. Es fällt auf, dass gerade um den Höchstwert eine sehr große Diskrepanz zwischen den beiden Systemen besteht: das *Emit II* System verhält sich relativ einheitlich, wo hingegen das *DRI* gerade hier ein breites Spektrum bietet. Ebenso findet sich auch im restlichen Diagramm eine hohe Streuung, welche nicht mathematisch korreliert werden kann.

Dies zeigt, dass das *DRI* Verfahren gegenüber dem *Emit II* im Vergleich weniger für eine korrelative, wohl aber für eine qualitative Aussage geeignet wäre.

5.3.5 Cocain und Benzoyllecgonin

Messprotokoll

In der Gruppe des Cocains wurden insgesamt 200 Urinproben im Vergleich auf den beiden EIA Systemen *DRI* und *Emit II* getestet.

Der Cut-Off-Wert wurde zur besseren statistischen Aussagekraft für die zwei Systeme einheitlich festgelegt.

Der Wert beträgt für Cocain, genauer gesagt für Benzoyllecgonin 300 ng/ml.

Aufgrund des oben genannten Wertes wurden im *Emit II* Verfahren, welches als Referenz für das *DRI* EIA verwendet wird, 80 Proben positiv auf Cocain, beziehungsweise dessen Metabolite im Urin getestet.

Qualitative Auswertung

Das Ergebnis des Vergleichstests *DRI* lautet wie folgt:

Coc DRI				
Coc Emit	negativ	positiv	Gesamt	
				Sensitivität = $77/80 =$ 96,2 %
negativ	120	0	120	Spezifität = $120/120 =$ 100 %
positiv	3	77	80	Pos. präd. Wert = 100 %
Gesamt	123	77	200	Neg. präd. Wert = 97,5 %

Tab. 5.15: Qualitative Auswertung von *DRI* versus *Emit II* für Cocain

Die Kontrolle mit *CEDIA* ergab folgende Ergebnisse:

Coc DRI				
Coc CEDIA	negativ	positiv	Gesamt	
				Sensitivität = $79/79 =$ 100 %
negativ	121	0	121	Spezifität = $121/121 =$ 100 %
positiv	0	79	79	Pos. präd. Wert = 100 %
Gesamt	121	79	200	Neg. präd. Wert = 100 %

Tab. 5.16: Qualitative Auswertung von *DRI* versus *CEDIA* für Cocain

Coc Emit				
Coc CEDIA	negativ	positiv	Gesamt	
				Sensitivität = $79/79 =$ 100 %
negativ	120	1	121	Spezifität = $120/121 =$ 99,1 %
positiv	0	79	79	Pos. präd. Wert = 98,7 %
Gesamt	120	80	200	Neg. präd. Wert = 100 %

Tab. 5.17: Qualitative Auswertung von *Emit II* versus *CEDIA* für Cocain

Bewertung

Bei Betrachtung der oben vorliegenden Ergebnisse fällt auf, dass sich alle Ergebnisse im Bereich oberhalb der 90 % Marke befinden¹⁷.

Des Weiteren bemerkt man, dass der *DRI* EIA mit 96,2 % nicht nur eine sehr gute Sensitivität aufweist, sondern auch ein positives Ergebnis in jedem Fall voraussagen könnte. Umgekehrt verhält es sich bei den negativen Werten, wo er zwar in 100 % der Fälle eine negative Probe erkennt und dennoch eine geringe falschnegative Rate präsentiert (97,5 % negativ prädikativer Wert), also einige Proben als negativ ansieht obwohl diese positiv sind.

Zum Vergleich wurde hier ebenso wie bei den vorherigen Substanzen das *CEDIA* System hinzugezogen. Wie aus obiger Tabelle ersichtlich, zeigt sich für den *DRI* Assay eine bemerkenswerte hundertprozentige Übereinstimmung mit den *CEDIA* Ergebnisse.

Der *Emit II* Assay weist ebenfalls sehr hohe qualitative Korrelationen mit *CEDIA* auf, unterscheidet sich lediglich in einer falschpositiv ermittelten Probe von den anderen beiden Assays (siehe Tab. 5.16 und 5.17). Dies spiegelt sich auch im Vergleich *DRI* zu *Emit II* wieder, wo positive Proben im *Emit II* Verfahren für falschnegative Ergebnisse sorgen.

Dies zeigt, dass *Emit II* wie auch bei vorherigen Metaboliten eine Schwäche in der Erfassung positiver Proben aufweist, damit ist das *DRI* Verfahren qualitativ aussagekräftiger.

¹⁷ Diese statistisch äußerst bemerkenswerten Ergebnisse unterstreichen die aufgestellten Thesen zum Cocain in den Kapitel 2.3.2 und 3.4.3, dass die Detektion von dessen Metaboliten durch den Einsatz eines hochspezifischen Monotests möglich ist. Da das Benzoyllecgonin den Hauptmetaboliten im Urin darstellt, und alle hier ausgewerteten Assays versuchen, diese Substanz nachzuweisen, kann man die sonst sicherlich verblüffende Übereinstimmung der Testergebnisse erklären.

Korrelative Daten

Aufgrund einer größeren Anzahl von Werten zwischen dem Cut-Off Wert und dem höchsten für die zwei Systeme einheitlich festgelegten Wert, kann versucht werden, anhand folgenden Diagramms eine Beziehung zwischen *DRI* und *Emit II* für Cocain zu etablieren:

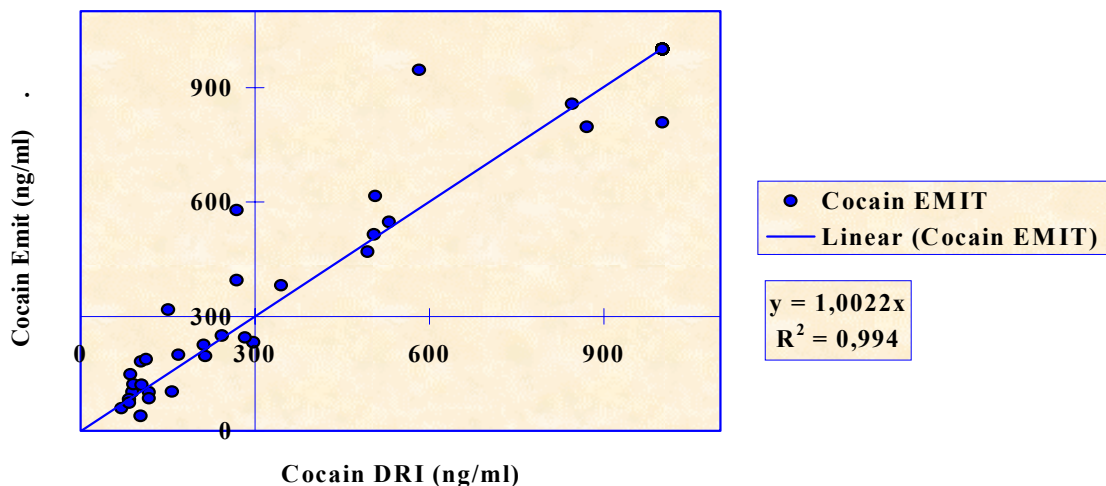


Abbildung 5.6: Cocain – Relation zwischen *DRI* und *Emit II*

Bewertung

Bei näherer Betrachtung des oben aufgeführten Diagramms ist erkennbar, dass bei den Cocain Werten im Gegensatz zu den anderen Substanzen prinzipiell eine Korrelation vorhanden ist, wenn eine größere Anzahl der Werte zwischen dem Cut-Off und dem Höchstwert vorhanden wäre. Hier ist ersichtlich, dass sich die wenigen Daten, welche sich in diesem Bereich auftreteten und nicht den Höchstwert von 1000 ng/ml überschreiten, relativ an der versuchten Regressionsgeraden anliegen, bzw. nur eine geringe Abweichung davon zeigen.

So würde man das Cocain nicht nur qualitativ gut erfassen, sondern ebenso Korrelationen zwischen den verschiedenen Assays etablieren können – im Falle einer größeren Stichprobe mit Werten in oben erwähntem relevantem Bereich.

5.3.6 Cannabinoide und THC

Messprotokoll

In der Gruppe der Cannabinoide wurden insgesamt 213 Urinproben im Vergleich auf den zwei EIA Systemen *DRI* und *Emit II* getestet.

Der Cut-Off-Wert wurde zur besseren statistischen Aussagekraft für die zwei Systeme einheitlich festgelegt.

Der Wert beträgt für das THC 50 ng/ml.

Aufgrund des oben genannten Wertes wurden im *Emit II* Verfahren, welches als Referenz gegenüber den anderen beiden EIA verwendet, 90 Proben positiv auf Cannabinoide, beziehungsweise deren Metabolite im Urin getestet.

Qualitative Auswertung

Das Ergebnis des Vergleichstest *DRI* lautet wie folgt:

THC DRI				
THC Emit	negativ	positiv	Gesamt	
negativ	123	0	123	Sensitivität = $82/90 = 91,1 \%$
positiv	8	82	90	Spezifität = $123/123 = 100 \%$
Gesamt	131	82	213	Pos. präd. Wert = 100% Neg. präd. Wert = 94,6 %

Tab. 5.18: Qualitative Auswertung von *DRI* versus *Emit II* für THC

Die Kontrolle mit *CEDIA* ergab folgende Ergebnisse::

THC DRI				
THC CEDIA	negativ	positiv	Gesamt	
				Sensitivität = 81/81 = 100 %
negativ	131	1	132	Spezifität = 131/132 = 99,2 %
positiv	0	81	81	Pos. präd. Wert = 98,7 %
Gesamt	131	82	213	Neg. präd. Wert = 100 %

Tab. 5.19: Qualitative Auswertung von *DRI* versus *CEDIA* für THC

THC Emit				
THC CEDIA	negativ	Positiv	Gesamt	
				Sensitivität = 81/82 = 98,7 %
negativ	123	8	131	Spezifität = 123/131 = 93,8 %
positiv	1	81	82	Pos. präd. Wert = 91 %
Gesamt	124	89	213	Neg. präd. Wert = 99,1 %

Tab. 5.20: Qualitative Auswertung von *Emit II* versus *CEDIA* für THC

Bewertung

Bei Betrachtung der oben vorliegenden Ergebnisse bemerkt man, dass der *DRI* EIA zwar eine relativ schlechtere Sensitivität aufweist mit 91,1 % im Vergleich zum *Emit II* System (betrachtet man vorherige Substanzgruppen und deren Sensitivitäten), aber jede positive Probe auch als positiv erkannt hat. Dennoch zeigt sich bei einer hundertprozentigen Spezifität, dass der *DRI* auch eine negative Probe in 94,6 % der Fälle voraussagen würde, somit der *DRI* im Vergleich zum *Emit II* für negative Probenerkennung geeignet scheint.

Bei Vergleich der Systeme *Emit II* und *DRI* im Bezug auf den *CEDIA* Assay zeigt sich, dass der *DRI* eine Sensitivität von 100% aufweist weshalb man ihn hiermit auch für die Erfassung positiver Proben gut verwenden könnte.

Die Frage bleibt nun, warum dieses Ergebnis nicht annähernd deckungsgleich mit dem aus dem Vergleich *DRI* zu *Emit II* ist, wo die Detektion positiver Proben ein schlechteres „outcome“ aufweist. Betrachtet man dazu die Ergebnisse aus dem Vergleich *Emit II* zu *CEDIA*, so fällt am ehesten die hohe falschpositive Rate an Proben auf, also Proben, die eigentlich vom Referenztest *CEDIA* als negativ bewertet (chromatographisch gesichert), vom *Emit II* Verfahren aber als positiv erkannt wurden. Aus diesem Ergebnis folgt ein niedrigerer Positiv prädikativer Wert (91,0 %), der somit auch die geringere Sensitivität vom *DRI* im Vergleich zum *Emit II* bedingt.

Somit eignet sich der *DRI* beim Austesten der THC Substanzgruppe ebenfalls als Screening Test und ist in diesem Fall dem *Emit II* sogar in der Nachweisbarkeit überlegen¹⁸.

¹⁸ Im Falle des THC sei nochmals auf die unterschiedlichen Meinungen des Herstellers wie auch der Literatur verwiesen (12, 13, 14, 28), was die Wahl des Cut-off-Wertes betrifft. Auch in diesem Fall lassen sich verschiedene Angaben wie 20, 50 oder 100 ng/ml finden. Im Fall dieser Dissertation wurde ein Schwellenwert von 50 ng/ml verwendet zur Berechnung der Statistik, dem interessehalber wurden jedoch auch Berechnungen mit einem Cut-off von 20 ng/ml erstellt, wo sich jedoch extreme Diskrepanzen zwischen den Vergleichen von *CEDIA*, *DRI* und *Emit II* ergaben. Dies führte zu dem Schluss, dass die Systeme doch mehr mit einem Cut-off von 50 ng/ml verwendet werden müssen, selbst wenn Hersteller auch einen niederen Cut-off empfehlen.

Korrelative Daten

Aufgrund einer größeren Anzahl von Werten zwischen dem Cut-off-Wert und dem höchsten für die zwei Systeme einheitlich festgelegten Wert, ergibt sich beim THC die Möglichkeit einer korrelativen Beziehung anhand des folgenden Diagramms.

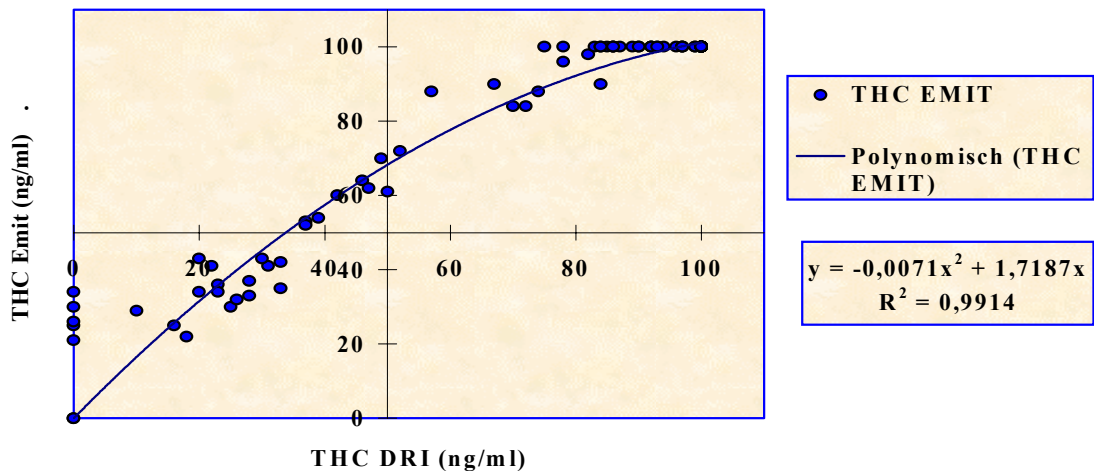


Abbildung 5.7: Cannabinoide (THC) – Relation zwischen *DRI* und *Emit II*

Bewertung

Bei dem oberhalb dargestellten Diagramm lässt sich feststellen, dass sich im Bereich zwischen dem Cut-off und dem Höchstwert, welcher für beide Systeme einheitlich auf 100 ng/ml festgelegt wurde, eine sehr gute korrelative Aussage machen lässt. Hierbei wurde in dieser Studie versucht, eine polynomische Regressionskurve in das Diagramm zu zeichnen, an welcher sich die Werte äußerst gut nähern. Lediglich zwischen 20 und 35 ng/ml findet sich eine leichte Streuung, die nicht mit der Polynomkurve zusammenfällt.

Somit lässt sich für das THC im Gegensatz zu allen anderen Substanzen in dieser Studie erkennen, dass die beiden EIA *DRI* und *Emit II* sich sehr gleichen, eine statistisch korrelative Aussage hier also durchaus möglich wäre.

Das *DRI* System beweist nicht nur eine äußerst überzeugende qualitative Aussage sondern erlaubt im Bereich zwischen 20 und 100 ng/ml auch eine korrelative Aussage, wenn man das *Emit II* System als Referenz nimmt.

5.4 Tabellarische Zusammenfassung der Statistik

Um eine überschaubare Darstellung der Studie zu präsentieren, wurden die statistischen Ergebnisse nochmals in folgender Tabelle zusammengefasst. Für genauere Angaben bezüglich absoluter Werte der positiven oder negativen Proben sei auf das Kapitel 5.3 verwiesen.

Testvergleich Benzodiazepine	Sensitivität	Spezifität	Positiv prädik- tiver Wert	Negativ prädika- tiver Wert
DRI vs. Emit	97,6 %	95,2 %	93,1 %	98,3 %
CEDIA vs. DRI	96,6 %	98,3 %	97,7 %	97,3 %
CEDIA vs. Emit	94,3 %	100 %	100 %	96 %

Testvergleich Amphetamine¹⁹	Sensitivität	Spezifität	Positiv prädika- tiver Wert	Negativ prädika- tiver Wert
DRI vs. Emit	100 %	96,1 %	93,6 %	100 %
CEDIA vs. DRI	97,2 %	93,8 %	89 %	98,4 %
CEDIA vs. Emit	94,5 %	95,4 %	92 %	96,8 %

Testvergleich Opiate	Sensitivität	Spezifität	Positiv prädika- tiver Wert	Negativ prädika- tiver Wert
DRI vs. Emit	100 %	95,6 %	95,4 %	100 %
CEDIA vs. DRI	98,1 %	98,2 %	98,1 %	98,2 %
CEDIA vs. Emit	95,4 %	100 %	100 %	95,7 %

Tab. 5.21: Tabellarische Zusammenfassung aller statistischen Ergebnisse bezüglich des Vergleichs von *DRI*, *Emit II*, und *CEDIA*

¹⁹ In der obigen Tabelle sind bezüglich der Amphetamine nur die Ergebnisse bei dem Cut-Off Wert von 500 ng/ml aufgeführt, da dieser in der vorherigen statistischen Auswertung als der Übereinstimmende hervorgekommen ist.

Testvergleich Methadon	Sensitivität	Spezifität	Positiv prädika- tiver Wert	Negativ prädika- tiver Wert
DRI vs. Emit	96,3 %	94,9 %	93,3 %	100 %
CEDIA vs. DRI	96,3 %	100 %	100 %	97,3 %
CEDIA vs. Emit	90,3 %	100 %	100 %	92,4 %

Testvergleich Cocain	Sensitivität	Spezifität	Positiv prädika- tiver Wert	Negativ prädika- tiver Wert
DRI vs. Emit	96,2 %	100 %	100 %	97,5 %
CEDIA vs. DRI	100 %	100 %	100 %	100 %
CEDIA vs. Emit	100 %	99,1 %	98,7 %	100 %

Testvergleich THC	Sensitivität	Spezifität	Positiv prädika- tiver Wert	Negativ prädika- tiver Wert
DRI vs. Emit	91,1 %	100 %	100 %	94,6 %
CEDIA vs. DRI	100 %	99,2 %	98,7 %	100 %
CEDIA vs. Emit	98,7 %	99,2 %	98,7 %	100 %

Tab. 5.21ff: Tabellarische Zusammenfassung aller statistischen Ergebnisse bezüglich des Vergleichs von *DRI*, *Emit II*, und *CEDIA*

Aufgrund der im vergangenen Kapitel beschriebenen Ergebnisse lässt sich zusammenfassen, dass sich der *DRI* Enzymimmunoassay gut mit dem *Emit II* System vergleichen lässt. Mängel, die bei fast jedem Metaboliten in der statistischen Auswertung aufgetreten sind, wurden mit Hilfe des *CEDIA* Systems zu kontrollieren versucht. Dabei ergab sich, dass das *Emit II* System des öfteren falschnegative (bei Opiaten, Benzodiazepine und beim Methadon) oder auch falschpositive Ergebnisse (bei THC und Cocain) lieferte. Dies führte infolgedessen beim Vergleich von *DRI* und *Emit II* zu kleineren, aber auffälligen statistischen Divergenzen.

Bei der Kontrolle mit dem *CEDIA* System zeigte sich, dass der *DRI* Assay in manchen oben erwähnten Metaboliten dem *Emit II* in der qualitativen Aussagekraft überlegen war, sich aber dennoch zwischen den beiden Assays eine gute Korrelation finden ließ.

6 Diskussion

Im Bereich der forensischen Toxikologie, bzw. dem hier präsentierten Ausschnitt – der Detektion von illegalem Drogenkonsum in menschlichen Urin –, ist die Präzision von Screeningmethoden von entscheidender Bedeutung. Da ihre Ergebnisse weitreichende Konsequenzen haben können – vom Drogenkonsumverdacht bis zur Entdeckung einer eventuell lebensgefährlichen Vergiftung –, sind diese Testverfahren als Vorläufer weiterer Bestätigungsmethoden wichtige Triage Instanzen.

Die in den letzten Kapiteln erwähnten Ergebnisse sollen nun mit der dazu gehörigen Literatur – oder zumindest einem Ausschnitt davon –, verglichen werden, um das *DRI* System im Hinblick auf das *Emit II* Verfahren zu bewerten.

Zu allererst sollte erwähnt werden, dass eine Studie mit ähnlichem Protokoll bereits 1998 auf dem BM Hitachi 911 durchgeführt wurde (11), um die Systeme *DRI* und *Emit II* zu vergleichen. Es wurden damals wie heute die hier in der Studie getesteten Substanzen, bzw. deren Metabolite untereinander verglichen, dem hinzufügend noch Barbiturate, trizyklische Antidepressiva und Ethanol. Ebenso wie in dieser Studie gelangten die Autoren in Ihrer Bewertung zu der Auffassung, dass zwischen den beiden Immunoassays qualitativ eine gute Übereinstimmung zu finden sei, negative Ergebnisse (12 Proben) bei beiden Assays gleich bewertet wurden. Es wurde für THC ebenfalls eine semiquantitative Auswertung vollzogen – sogar bis zu Werten um 200 ng/ml, welche zur Schlussfolgerung kommt, dass semiquantitative Aussagen für THC denkbar wären. Des Weiteren wurde ein Kalibrationsverlauf durchgeführt, um die Stabilität der Kalibratoren zu überprüfen, was in dieser Arbeit nicht berücksichtigt wurde (siehe Kapitel 4.2).

Nichts desto trotz unterscheiden sich die hier vollzogenen Messungen von denen im Jahre 1998, da das Messprotokoll für jeden Metabolit eine Mindestanzahl von 70 positiven Proben festgelegt wurden, im Gegensatz von 15 bis 20 in erwähnter Publikation, ebenso 100 Negativ Proben für jede Substanzklasse. Des Weiteren stellte das *CEDIA* Verfahren die eigentliche Kontrolle dar, selbst wenn in erster Linie *Emit II* und *DRI* verglichen werden sollten. Es konnten somit ebenso Ergebnisse von *Emit II* überprüft werden, was für die Beurteilung von *DRI* von Bedeutung gewesen ist. Für die Amphetamine wurden in diesem Studienprotokoll verschiedene Cut-Off-Werte verglichen, wobei aus dem Artikel von 1998 nicht hervorging, mit welchen Werten die Auswertung

vorgenommen wurde, somit die postulierte Aussage, dass *DRI* Verfahren hätte eine Schwäche für die Erkennung positiver Proben, nicht bestätigt werden kann.

Dennoch sei festzuhalten, dass aufgrund dieser bereits durchgeführten Untersuchung es nunmehr möglich ist, mit Ergebnissen der im fünften Kapitel präsentierten Auswertung die Aussage zu stützen, dass das *DRI* System eine geeignete Screeningmethode für die getesteten Substanzen darstellen kann.

Um die vorher erwähnten Thesen und Argumente zu unterstreichen, soll die Aufmerksamkeit zunächst auf das *CEDIA* Verfahren gelenkt werden, das die Basis der hier zu bewertenden Ergebnisse liefert.

Das *CEDIA* Verfahren wurde zum Zeitpunkt der in der Rechtsmedizin München durchgeführten Studie als Routinescreeningverfahren verwendet. Positive Ergebnisse wurden mit Bestätigungsmethoden wie der Gaschromatographie und Massenspektrometrie (GC-MS) kontrolliert, negative Ergebnisse wurden als solche angesehen. Wie aus einer Auswahl der Literatur hervorgeht (6, 8, 9, 15), erweist sich der *CEDIA* Assay als qualitativ hochwertig und äußerst geeignet für das Screening der untersuchten Substanzen und einigen mehr. Vom Correctional Service of Canada wurde im Rahmen eines Drogenscreening Programms ein Report über den Nutzen und die Möglichkeiten von Screeningverfahren verfasst (8). Dabei wurden die im Rahmen von forensischen Untersuchungen gesammelten Proben mit dem *CEDIA* System und dem ELISA auf alle hier untersuchten Substanzen außer Methadon geprüft und positive Ergebnisse nochmals mittels GC-MS bestätigt oder widerlegt. Dabei fand man, dass bei einer Anzahl von 37230 Proben, 11400 als positiv von Seiten der Enzymimmunoassays bewertet wurden. Mittels GC-MS wurden alle Proben bestätigt, so dass die Autoren zu dem Schluss kamen, die Screeningverfahren als Standard in der Erstdiagnostik eines Drogenkonsums zu stellen, jedoch die Gaschromatographie weiterhin als Bestätigungsverfahren verwendet wird. In dieser Studie wurde zwar das *CEDIA* Verfahren an sich nicht in seiner Performance beurteilt, jedoch zeigt die Anzahl an positiven Proben, die durch den EIA herausgefunden und durch die GC-MS bestätigt wurde, dass dieser Assay sicherlich als Kontrolltest in einer Studie wie in dieser Dissertation eingesetzt werden kann.

Demnach wurde dieser Assay in dieser Studie als Referenz verwendet, um positive und negative Proben zu trennen. Dies brachte, wie bereits gesehen, den Vorteil, im Falle von Diskrepanzen zwischen *DRI* und *Emit II*, das erstere Verfahren besser beurteilen zu können und mögliche Fehlerquellen beim *Emit II* Assay zu finden. Vor allem von Nut-

zen war dieser Vergleich am Beispiel von THC, wo das *Emit II* Verfahren mit einer hohen Anzahl an falschpositiven Ergebnissen aufweist, das *DRI* System hingegen mit dem *CEDIA* gut korreliert.

Das *CEDIA* Verfahren konnte somit das zu untersuchende *DRI* System aufwerten und somit Anlass geben zu vermuten, dass zwischen *DRI* und *Emit II* trotz großer Ähnlichkeit im Grundaufbau gegebenenfalls Unterschiede in der Antikörperselektivität existieren, welche die Ursache dieser Diskrepanzen erklären können.

Um auf die einzelnen Drogen zurückzukommen, so stellt man fest, dass diese in der Literatur wie in der Studie verschiedene Schlussfolgerungen ermöglichen.

Beginnend mit den Benzodiazepinen sollte man bereits darauf hinweisen, dass die Kalibratoren sich für die drei verwendeten Assays unterscheiden. Im Gegensatz zu *Emit II* und *DRI*, welche auf Oxazepam geeicht werden, verwendet *CEDIA* Nitrazepam Kalibratoren. Dies könnte in der Auswertung mögliche Unterschiede erklären, unterstreicht jedoch die qualitative Aussagekraft des *DRI* Verfahrens gegen *Emit II* im Hinblick auf die Sensitivität, da trotz verschiedener Kalibratoren es 96,6% der Proben (im Gegensatz zu 94,3% beim *Emit II*) im Vergleich zum *CEDIA* Verfahren als positiv erkannt hat, somit ein gutes Screeningverfahren darstellt. Diesbezüglich wurden in einer 1994 durchgeführten Studie (6) das *Emit dau* Verfahren unter anderem mit dem GC-MS verglichen. Sicherlich handelte es sich dabei um einen Vorläufer des *Emit II* Assays, jedoch wies dieser signifikant schlechtere Ergebnisse auf (Sensitivität: 89,2%; Spezifität: 87,0%; Positiv prädikativer Wert: 74,6%; Negativ prädikativer Wert: 94,9%). Aufgrund des Vergleichs mit *CEDIA* liegt die Schlussfolgerung nahe, dass der *Emit II* gegenüber seinen Vorgänger sichtlich weiterentwickelt wurde. Im Vergleich der Kreuzreaktivitäten zeigt der *DRI* ebenso wie *CEDIA* geringe Kreuzreaktivitäten mit glucuronidierten Metaboliten auf, welche somit die statistischen Ergebnisse in dieser Studie rechtfertigen könnten.

Die bestehenden Diskrepanzen zwischen *DRI* und *Emit II* sind nicht auf die Glucuronidierung von Metaboliten zurückzuführen, da *Emit II* ebenfalls konjugierte Metabolite nicht erkennt. Eine Vergleichsstudie von 1994 (22) zwischen *Emit II* und TDx Immunoassays bezüglich der Benzodiazepine zeigte, dass ersterer adäquatere Ergebnisse lieferte, wenn Metabolite zuerst durch β -Glucuronidase hydrolisiert wurden. Da im Rahmen dieser Studie alle Versuche mit nicht hydrolisierten Urinen vollzogen wurden, könnte diese Tatsache nicht nur für die Benzodiazepine, sondern ggf. auch für die anderen Sub-

stanzklassen zutreffen. Was die unterschiedlichen Ergebnisse betrifft, so könnte die Feststellung, dass *DRI* geringere Kreuzreaktivitäten als *Emit II* und *CEDIA* für einige Benzodiazepine aufweist, außer für Oxazepam (siehe Kapitel 3.1.3) als Erklärung gesehen werden.

Bei den Amphetaminen verhalten sich Ergebnisse und Literatur sehr ambivalent. Allein die unterschiedliche Wahl des Cut-Off-Wertes birgt schon Diskrepanzen in der bereits präsentierten Statistik. Die in der bereits für die Benzodiazepine erwähnten Studie (6) ermittelten Ergebnisse für *EMIT dau* konnten für das *Emit II* in Hinsicht auf die Sensitivität nicht bestätigt werden (*Emit dau*: 79,6% Sensitivität), wobei 1994 ein Cut-Off von 300 ng/ml verwendet wurde. Die bereits 1998 durchgeführte Evaluation von *DRI* (21) zeigt mit 65% Sensitivität (13 positive Proben des *DRI* Assays in Bezug auf 20 beim *Emit II*) eine unzufrieden stellende Präzision des *DRI* Systems dar. Dieses Ergebnis kann entkräftet werden mit der Feststellung, dass in dieser Studie keine Angaben über verwendete Cut-Off-Werte für die Amphetamine erwähnt wurden und die Probenanzahl zu gering erscheint um eine Aussage darüber treffen zu können. Aufgrund der unterschiedlichen Cut-Off Auswertung in Kapitel 5 lässt sich sagen, dass sich beim *DRI* Verfahren und dem *Emit II* bei einem Cut-Off-Wert von 500 ng/ml eine überzeugende Übereinstimmung finden lässt, was zum größten Teil auch das *CEDIA* Verfahren bestätigt. Bei Betrachtung der Kreuzreaktivitäten zeigt sich wiederum, dass *Emit II* und *DRI* Ähnlichkeiten aufweisen und gleichermaßen MDA mehr als *CEDIA* erfassen, nicht jedoch MDMA. Somit fällt eine gewisse Selektion von Stoffen der gleichen Substanzklasse für die jeweiligen Assays auf, die einen Unterschied der Variationen in den vorliegenden Ergebnissen bewirken kann. Auch die Feststellung, das *Emit II* als einziger EIA bei Substanzen wie Benzphetamin, Phentermin und Phenmetrazin höhere Kreuzreaktivitäten als *DRI* wie auch *Cedia* präsentiert, könnte Diskrepanzen bei der Cut-off-Wert Differenzierung in der Statistik erklären, da mit höherem Cut-off man den Kreuzreaktivitätskonzentrationen oben genannter Substanzen näher kommt, somit *Emit II* eher mit diesen interagieren könnte.

Für die Opiate konnten in dieser Dissertation einschlägige Übereinstimmungen gefunden werden. Es findet sich hier eine 100 % Übereinstimmung in positiven Proben bezüglich *Emit II* und *DRI*. Auffallend hierzu sind die 5 Proben, welche vom *Emit II* als falschnegativ bezüglich *DRI* erkannt wurden. Da *DRI* im Vergleich mit *CEDIA* diesbe-

züglich besser abschneidet mit statistischen Werten über 98 %, und *Emit II* gegenüber *CEDIA* ebenso mit 95,4 % Sensitivität schlechter bewertet wird, könnte die Diskrepanz bei erstem Vergleich wohl dem *Emit II* System zugeschrieben werden.

Im Gegensatz zur 1998 Studie (11) zeigt der *DRI* Assay in dieser Dissertation in der Erkennung von Opiaten ein gutes „outcome“. In der 1998 Studie wurden nämlich von 20 Proben nur 17 positiv für Opiate erkannt, in der GC-MS fand sich jedoch in allen Proben Metabolite von Opiaten. Somit konnte der *DRI* seinerzeit nur eine Sensitivität von 85% aufweisen, in der jetzt durchgeführten Studie lagen die Ergebnisse signifikant darüber, vielleicht auch eine Folge der höheren Probenanzahl. Damit ist der *DRI* als Assay ebenso für das Screening von opiatverdächtigen Proben zu verwenden.

Betrachtet man hier die Kreuzreaktivitäten der beiden Assays, so fällt auf, dass *Emit II* die 3O-glucuronidierte Form des Morphins – den Hauptmetaboliten – schlechter erkennt als *DRI* und *CEDIA* aufgrund höher Kreuzreaktionskonzentrationen. Dies könnte als Erklärung für diskrepante Ergebnisse zwischen den Assays gesehen werden.

Hinzu kommt, dass bezüglich 6-MAM die selbe Feststellung zu machen ist (*Emit II* besitzt für diesen Metaboliten eine niedrigere Kreuzreaktivität als *CEDIA* und in diesem Fall auch *DRI*), dieses wurde jedoch in der Dissertation nicht mitbewertet und somit ergab sich kein direkter Vergleich zwischen positiven Opiatproben und der gleichzeitigen Präsenz von 6-MAM.

Da das Methadon ein Opioid ist, gelten für diese Substanz ähnliche Anmerkungen wie für die eben beschriebene Substanzklasse. Die bereits erwähnte statistische Studie von 1994 (6) bestätigt mit Ergebnissen von *Emit dau* die in Kapitel 5 ermittelte Statistik für *Emit II* Verfahren mit Werten über 98% für alle statistischen Parameter. Damit scheint es ebenfalls nicht verwunderlich, dass die Ergebnisse der drei Assays für Methadon äußerst signifikant übereinstimmen, was die *DRI* Studie von 1998 ebenfalls bestätigt (11). Da bereits der Vergleich der Kreuzreaktionen mit anderen Metaboliten in Kapitel 3.3.3 ergab, dass alle Assays für Methadon aufgrund des selektiven Nachweis dieser Substanz beinahe spezifische Monotests darstellen, erscheinen die gute Übereinstimmung der statistischen Ergebnisse nicht verwunderlich. Dennoch bliebe es zu überprüfen, wie sich die Assays in Präsenz von Morphin, Heroin und anderer Opiate oder deren glucuronidierter Metabolite verhalten, da auf diese Fragestellung in dieser Studie nicht eingegangen wurde.

Das Cocain verhält sich ebenso wie der vorherige Metabolit. Als einzige Substanz dieses Messprotokolles weist hier der *DRI* eine 100% Übereinstimmung mit dem *CEDIA* Verfahren in allen statistischen Parametern, ebenso im Vergleich zum *Emit II* Verfahren bei der Spezifität und positiv prädikativen Wert. Ebenso weist *Emit II* hochsignifikante Korrelationen zu *CEDIA* auf, was den Beweis liefert, dass es sich beim Cocain wohl um den öfters erwähnten hochspezifischen Monotest handelt, wobei Benzoyllecgonin als Hauptmetabolit im Urin nachgewiesen wird. Diese überzeugenden Ergebnisse werden auch durch die bereits für die erwähnten Substanzen erwähnten Studien gestützt (2, 6, 8, 11, 16). Zu erwähnen sei jedoch die Diskrepanz zwischen *DRI* und *CEDIA* beim Nachweis des Cocaethylens (siehe Kapitel 3.4.3), wo allein die gleichzeitige Präsenz von Alkohol und Cocain diesen Metaboliten entstehen lässt, welcher vom *DRI* nicht erkannt wird, das *CEDIA* System jedoch eine beinahe 100% Kreuzreaktivität aufweist. Diese Tatsache könnte im Falle eines Drogenscreenings mit oben beschriebenen Substanzen zu falschnegativen Ergebnissen führen..

Die Cannabinoide mit ihren Hauptmetabolit Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THCCOOH) sorgten im Rahmen dieser Dissertation für die größten Diskrepanzen in der statistischen Auswertung. Im Gegensatz zu 1998 durchgeführten Vergleichen zwischen den Systemen *DRI* und *Emit II* (11) fand sich nur eine 91,1% Sensitivität für *DRI* in Bezug auf *Emit II* mit einem prädikativen Wert von 100 %. In Bezug auf *CEDIA* wurde *DRI* aufgewertet, jedoch erbrachte es nicht die 100 % Ergebnisse wie das Cocain, obwohl die drei Assays für Cannabinoide auch hochspezifisch nur Δ^9 -THCCOOH nachweisen.

Irving et al erwähnen bereits in einer Studie über verschiedene Immunoassays (16), dass die *Emit* Assays zwar eine hohe Sensitivität jedoch eine niedrige Spezifität besitzen, dies bedingt durch die hohe Kreuzreaktivität des Antiserums mit allen an neunter Stelle substituierten Metabolite, die Glucuronide mit eingeschlossen. Diese Feststellung wurde ebenfalls durch Huestis et al im Rahmen einer Studie zur Nachweiszeit von Cannabis Metabolite aufgegriffen (15), in welcher neben *Emit II* auch *DRI* als EIA zusammen mit der GC-MS verwendet wurden. Da die Studie sich hauptsächlich um die Nachweiszeit dreht, ist sie für die hier zu beurteilenden statistischen Parameter nicht von vorrangigem Interesse, jedoch soll festgehalten werden, dass in ihr ebenso wie bereits bei den Amphetaminen unterschiedliche Cut-Off-Werte verwendet wurden (50 wie 100 ng/ml), was im Rahmen der Dissertation nicht verglichen wurde. Bei beiden Cut-Off-Werten fanden die Autoren heraus, dass *DRI* im Gegensatz zu *Emit* Assays geringere Nachweiszeiten

aufwies, ebenfalls ein Grund der bereits von Irving et al erwähnten Kreuzreaktivität, welche auch die in der Dissertation dargelegten Ergebnisse erklären könnte. Dennoch soll festgehalten werden, dass Rückschlüsse auf Einnahmezeiten von Ergebnissen eines Assays mit Vorsicht zu interpretieren sind, da diese Testverfahren hauptsächlich eine qualitative, jedoch weniger eine semiquantitative Aussage machen können.

Da sich die Hersteller von *DRI* und *Emit II* in ihren Angaben bezüglich der Glucuronide nicht äußerten, konnte hier kein Vergleich zwischen den beiden Assays oder hinsichtlich des CEDIA Verfahrens gemacht werden.

Abschließend sollte noch die korrelative Auswertung erwähnt werden, welche für das THC bereits 1998 durchgeführt wurde (11) und in der jetzigen Dissertation ebenfalls präsentiert wurde.

Im Gegensatz zu vorangegangener Studie, wurde hier versucht, bei allen Substanzklassen diese Auswertung vorzunehmen. Letztendlich konnten neben dem THC nur noch das Cocain eine vernünftige Korrelation gefunden werden – für das THC legten sich die Werte einer polynomischen Kurve an.

Für das Cocain folgen die Werte einer Gerade, jedoch sind die Anzahl an Proben zu gering um eine absolute Aussage zu zulassen.

Dies soll unterstreichen, dass die Verfahren *DRI* und *Emit II* Assay in der Ermittlung der Ergebnisse sich bei einigen Substanzklassen erstaunliche Übereinstimmungen aufweisen.

7 Zusammenfassung und Schlusswort

Diese Dissertation zusammenfassend wurde versucht, eine, für den Mediziner und den Patienten unübersichtliche, dem Laborchemiker jedoch wohl bekannte Arbeitstechnik zu beschreiben.

Ausgehend von der heutigen Drogenszene, welche anfangs kurz erwähnt wurde, war es das Ziel, einen Ausschnitt der Möglichkeiten zu erläutern, welche der Rechtsmedizin zur Verfügung stehen, um Drogen im Urin auf einfache Weise zu detektieren um sie dann spezifischeren, sehr viel aufwendigeren Techniken zur Weiterverarbeitung zu zuführen. Dabei standen die Enzymimmunoassays im Vordergrund, deren Prinzip und Unterschiede im Folgenden erläutert wurden. Es sollten drei EIA hervorgehoben werden, das *DRI*, *Emit II* und *CEDIA* Verfahren.

Nach Präsentation der Substanzklassen, mit welchen diese drei Assays verglichen wurden, folgte eine kurze Darstellung des Multisystemanalyzers, welcher die Messungen erst ermöglichte.

Nach statistischer Auswertung der Messwerte wurden diese nochmals mit der aktuellen Literatur verglichen, um deren Bedeutung hervorzuheben.

Abschließend lässt sich sagen, dass der Enzymimmunoassay eine bedeutende Rolle im laborchemischen Alltag besitzt. Die Ungenauigkeit, welche in wenigen Ergebnissen dieser Dissertation dem Immunoassay in seine Bedeutung schmälern könnte, sollte nicht von der Tatsache ablenken, dass er durch seine schnelle und unkomplizierte Handhabung nicht nur zeitsparender, sondern ebenfalls effektiv eine große Anzahl an Proben verarbeiten kann.

Sicherlich wird es immer wieder Weiterentwicklung der hier angewandten Methoden geben, und die Möglichkeit bestehen, eines Tages ein effektiveres Testverfahren zu entwickeln, jedoch bis zu diesem Zeitpunkt sollte der Immunoassay weiterhin Bestandteil der laborchemischen Routine bleiben.

Somit kann man nur die Forschung ermutigen, die Entwicklungen auf diesem Gebiet weiter voran zu treiben, damit eines Tages diese Technik durch ihre Schnelligkeit und Unkompliziertheit auch dem praktizierenden Arzt zugänglich sein könnte.

8 Literaturverzeichnis

1. AGSA : **Swiss Guidelines for Drugs of Abuse Testing.**
<http://www.ichv.ch/AGSA/default.htm>. Version vom 13.02.2003
2. Aoki K., Yoshida T., Karoiwa Y.: **Forensic immunochemistry**
Forensic Sci Int 1996; 80 (1-2): 163-73
3. Bedienungsanleitung BM Hitachi 911, Kapitel 3.1: Funktionen und Abläufe.
4. Caplan Yale H.: **Abused Drugs Monograph Series „Cocaine“.**
Abbott Laboratories, Diagnostic Division, Irving Texas, 1988.
5. Drummer O.H., Odell M.: **The forensic pharmacology of Drugs of Abuse.**
Arnold, London, New York, New Delhi, 2001
6. Ferrara Sd., Tedeschi L., Frison G. et al: **Drugs of Abuse testing in urine: statistical approach and experimental comparison of immunobiochemical and chromatographic techniques.** J Anal Toxicol 1994; 18 (5): 278-91
7. Fooley Th.: **Enzyme Immunoassays.**
In John A. Adamovics: Analysis of Addictive and Misused Drugs. Verlag Marcel Dekker Inc, New York (USA), 1995, S. 232-280
8. Fraser AD., Zamecnik J., Kerarvel J. et al: **Experience with urine drug testing by correctional Service of Canada.**
Forensic Sci Int 2001;121 (1-2): 16-22
9. George S., Parmar S., Meadway C. et al: **Application and validation of a urinary methadone metabolite (EDDP) immunoassay to monitor methadone compliance.**
Ann Clin Biochem 2000 ; 37 (3): 350-4

10. Harms V.: **Biomathematik, Statistik und Dokumentation**
7. Auflage, Harms Verlag, Kiel, 1998

11. Haver V., Black D., Garbin J.: **Evaluation of DRI Drug of Abuse Reagents on the Hitachi 911.** J Anal Toxicol 1998; 22 (5): 403-4

12. **Herstellerinformationen zu: CEDIA Verfahren bezüglich Testverfahren, Reagenzien, Prinzip, Ergebnisse, Leistung für die Substanzklassen der Benzodiazepine, Amphetamine, Opiate, Methadon, Cocain und Cannabinoide.**
Boehringer Mannheim, 1997

13. **Herstellerinformationen zu: DRI Verfahren bezüglich Testverfahren, Reagenzien, Prinzip, Ergebnisse, Leistung für die Substanzklassen der Benzodiazepine, Amphetamine, Opiate, Methadon, Cocain und Cannabinoide.**
Diagnostic Reagents, Inc., Sunnyvale, California, 1998

14. **Herstellerinformationen zu: Emit II Verfahren bezüglich Testverfahren, Reagenzien, Prinzip, Ergebnisse, Leistung für die Substanzklassen der Benzodiazepine, Amphetamine, Opiate, Methadon, Cocain und Cannabinoide.**
Syva Company, Dade Behring Inc., USA, 1998

15. Huestis MA., Mitchell JM., Cone EJ.: **Detection time of marijuana metabolites in urine by immunoassay and GC-MS.** J Anal Toxicol 1995; 19 (6): 443-9

16. Irving J., Leeb B., Foltz RL. et al: **Evaluation of immunoassays for Cannabinoids in urine.** J Anal Toxicol 1984; 8 (4): 192-6

17. Jackson R.: **Urine drugs-of-abuse testing using recombinant technology**
Am Clin Lab 1997: 24-26

18. Julien R.M.: **Drogen und Psychopharmaka.**
Spektrum akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, 1997

19. Khanna P.L., Dworschack R. T.: **A new homogenous enzyme immunoassay using recombinant enzyme fragments.** Clin Chim Acta 1989; 185 (3): 231-9
20. Khanna P.L, Worthy T.E.: **A recombinant protein based homogeneous immunoassay.** Am Clin Lab 1989, Reprint
21. Külpmann W.-R.: **Nachweis und Bestimmung von Drogen im Urin mittels Immunoassays.** Deutsches Ärzteblatt 1996; 93 (42): A-2701
22. Meatherall R.: **Benzodiazepine Screening using Emit II and TDx: Urine Hydrolysis Pretreatment required.** J Anal Toxicol 1994; 18: 278-91
23. Peat Michael A.: **Abused Drugs Monograph Series „Cannabinoids“**
Abbott Laboratories, Diagnostic Division, Irving Texas, 1988
24. Penning R., Gilg Th., von Meyer L.: **Alkohol, Drogen und Verkehrssicherheit.**
in Penning: Rechtsmedizin systematisch, 3. Auflage, UNI-Med Verlag AG, Bremen
25. **Polizeiliche Kriminalstatistik** für den Freistaat Bayern 2000
26. Röhrig M.: **Drogen im Betrieb, einleitendes Referat.**
http://www.archido.de/volltext-publikationen/igm_drogen_betrieb.htm
IG Metall, Version 1.2, Juli 2001
27. Schütz H.: **Drogenscreening mit Immunoassays.**
Pharmazie in unserer Zeit 1999; 28 (6): 320-8
28. Vandevenne M., Vandenbusche H., Verstraete A.: **Detection time of Drugs of Abuse in urine.** Acta Clin Belg 2000; 55 (6): 323-33

29. Von Meyer L., Biro G., Degel F., Gruhl H, Hallbach J., van Heijst N.P., Köppel C.:
Immunchemische Verfahren.

In Gibitz J., Schütz H.: Deutsche Forschungsgesellschaft „Einfach toxikologische Laboruntersuchungen bei akuten Vergiftungen. Mitteilung XXIII der Senatskommission für klinisch-toxikologische Analytik, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim 1995, S. 232-280

Herrn Prof. Dr. Ludwig von Meyer erlaube ich mir, für die Überlassung des Themas und die freundliche Unterstützung bei der Anfertigung der Arbeit zu danken.

Bei Herrn Prof. Dr. Wolfgang Eisenmenger möchte ich mich für die Arbeitsmöglichkeit an seinem Institut bedanken.

Herrn PD. Dr. August König von der Medizinischen Klinik Ziemsenstr. möchte ich für die Hilfe bei der statistischen Auswertung meiner Dissertation danken.

Für die technische Assistenz danke ich Frau Gerlinde Schwarz.

Lebenslauf

Am 14. Juli 1977 wurde ich in München als Sohn des Dermatologen Dr. Friedrich Ryckmanns und seiner Ehefrau Dr. Marie-Cécile Wellano-Ryckmanns, geborene Wellano, Anästhesistin, geboren. Mein Vater ist Deutscher, meine Mutter Deutsch-Französin.

Nach der Volksschulzeit an der französischen Schule wurde ich 1988 in das französischsprachige Gymnasium Lycée Jean Renoir in München aufgenommen, an dem ich 1995 das französische Abitur ablegte.

Im Wintersemester 1995/96 begann ich mein Medizinstudium an der medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München, wo ich am 4. September 1998 die Ärztliche Vorprüfung, am 31. August 1999 den I. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, am 11. September 2001 den II. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und am 15. November 2002 den III. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung ablegte.

In der Zeit von November 1997 bis März 2001 war ich als Co-Assistent am histologischen Institut tätig und betreute die dort durchgeführten Kurse der Histologie.

Im praktischen Jahr verbrachte ich meine Ausbildung in der I. Medizinischen Klinik und in der Chirurgischen Klinik des Städtischen Krankenhauses München Harlaching, sowie in der Chirurgischen Klinik und Klinik für Anästhesiologie des Universitätsklinikums in Nîmes (Frankreich).

Seit 1995 bin ich als ehrenamtliches Mitglied im Katastrophenschutz bei der Hilfsorganisation Bayerisches Rotes Kreuz tätig und absolvierte in dieser Zeit die Ausbildung zum Rettungssanitäter, die ich mit der Abschlußprüfung am 18. Dezember 1999 abschloß.

Am 21. November 2002 erhielt ich die vorläufige Approbation als Arzt und habe am 01. Januar 2003 mit meiner Tätigkeit als Arzt im Praktikum in der Abteilung für Unfallchirurgie des Städtischen Krankenhauses München Harlaching begonnen.